

**Untersuchungen zur Schleimhautbesiedlung durch  
*Staphylococcus aureus* und Identifizierung von Adhäsions-  
Inhibitoren mit einem neu entwickelten Hochdurchsatz-  
Screeningverfahren**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Marina Melanie Steindorff (geb. Wöhl)  
aus Göttingen

1. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

2. Referent: Privatdozent Dr.-Ing. Max Schobert

eingereicht am: 13.07.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.10.2011

Druckjahr 2011

# Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Tagungsbeiträge

Wöhl, M., Peschel, A., Tegge, W.: Development of novel prophylactic approaches to prevent skin colonization by *S. aureus*. (Poster). Young microbiologists mini-symposium: microbe signaling, organization and pathogenesis, Cork, Irland (2009).

Wöhl, M., Peschel, A., Tegge, W.: Determination of bacterial adherence to eukaryotic cells utilizing an automated microscope. (Poster). 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. , Göttingen (2009).





# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Mikrobiologischer und medizinischer Hintergrund .....	5
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.1.2 MRSA .....	7
1.1.3 Biologie der nasalen Adhäsion.....	8
1.1.4 Pharmakologische Möglichkeiten zur Behandlung bzw. Prävention von <i>S. aureus</i> -Infektionen .....	9
1.1.5 Der Umgang mit der <i>S. aureus</i> - und MRSA-Problematik.....	10
1.2 Wirkstoffforschung mittels Hochdurchsatz-Screeningverfahren .....	13
1.2.1 Substanzsammlungen und Peptidbibliotheken.....	15
1.3 Cellulose-gebundene Peptidarrays .....	16
1.4 Transkriptomanalysen .....	18
1.5 Ziel der Arbeit .....	19
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.3 Kits .....	23
2.1.4 Chemikalien .....	24
2.1.5 Antikörper und Farbstoffe.....	24
2.1.6 Kulturmedien.....	24
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.8 Mikroorganismen und Zellkulturen .....	26
2.1.9 Testsubstanzen .....	27
2.1.10 Primer .....	28
2.1.11 Expressionsvektor.....	29
2.1.12 Enzyme.....	29
2.1.13 Software .....	29
2.2 Methoden .....	29
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	29
2.2.2 Arbeiten mit Zellkulturen .....	30

2.2.3	Entwicklung und Etablierung des Hochdurchsatz-Adhäsionsassays .....	32
2.2.4	Synthese rekombinanter Proteine .....	38
2.2.5	Protein-Protein-Interaktionsstudien .....	41
2.2.6	Transkriptomanalysen mittels <i>S. aureus</i> Genom-Microarrays .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1	Adhäsionsassay .....	49
3.1.1	Entwicklung und Etablierung .....	49
3.1.2	Screening verschiedener Substanzsammlungen und Peptidbibliotheken .....	61
3.1.3	Untersuchung der Aktivitäten der Hit-Substanzen .....	64
3.1.4	Ergebnisse der Nachuntersuchungen der Hits .....	65
3.1.5	Exkurs: Substanz HZI10687B10 .....	69
3.1.6	Weitere Charakterisierung der Wirkstoffkandidaten Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin .....	70
3.1.7	Eigenschaften von Aurintricarbonsäure und weiterführende Tests zur Charakterisierung der Wirkung .....	78
3.1.8	Versuche zur Identifizierung wirkungsrelevanter Strukturelemente .....	81
3.2	Protein-Protein-Interaktionsstudien .....	85
3.2.1	Herstellung der Proteine und Peptide .....	85
3.2.2	Ergebnisse des Protein-Protein-Interaktionsstudien .....	87
3.2.3	Überprüfung der rekombinanten Proteine .....	89
3.3	Transkriptomanalysen .....	91
3.3.1	Darstellung der Versuchsbedingungen .....	91
3.3.2	Qualität der Transkriptomanalysen .....	92
3.3.3	Ergebnisse der Transkriptomanalysen .....	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>107</b>
4.1	Adhäsionsassay .....	107
4.1.1	Entwicklung des Verfahrens .....	107
4.1.2	Quantifizierung mit Hilfe des IXM .....	109
4.1.3	Ergebnisse der Screenings .....	111
4.1.4	Weitere Charakterisierung der Wirkstoffkandidaten Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin .....	113
4.1.5	Versuche zur Identifizierung wirkungsrelevanter Strukturelemente .....	116
4.1.6	Publizierte Daten über Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin .....	117
4.2	Protein-Protein-Interaktionsstudien .....	119
4.3	Transkriptomanalysen .....	120
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>129</b>

<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>147</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	147
7.2	Tabellenverzeichnis .....	150
7.3	Peptidsequenzen .....	151
	<b>Danksagung.....</b>	<b>155</b>



# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANM	Artifiziellles Nasales Medium
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATA	Aurintricarbonsäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicinchonininsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzgl.	bezüglich
c	(Stoffmengen- oder Partikel-) Konzentration
cDNA	Kopie-DNA ( <i>Copy-DNA</i> )
CP	Capsuläre Polysaccharide
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid (A-, C-, G-, T-)-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	et alii (und andere [Autoren]; bei Literaturziten)
FBS	Fötales Kälberserum
FC	<i>Fold Change</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein (Green fluorescent protein)
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
h	Stunde(n)

His	Histidin
HNEPC	Humane nasale Epithel-Primärzellen ( <i>Human Nasal Epithelial Primary Cells</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horse Radish Peroxidase</i> )
IC <sub>x</sub>	Wirkstoffkonzentration bei Verringerung des gewünschten Effekts um X %
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IXM	ImageXpress Micro
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1000 bp)
KBE	Koloniebildende Einheit
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
LTA	Lipoteichonsäure ( <i>Lipoteichoic acid</i> )
M	molar, mol/l (Stoffmengenkonzentration)
m	milli
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>matrix assisted laser desorption ionization</i> )
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
NUSE	<i>Normalized unscaled standard error</i>
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster ( <i>Open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
POD	<i>peroxidase-based secondary detection systems</i>
Poly(I)	Polyinosinsäure ( <i>Polyinosinic acid</i> )
PSH	Pseudohypericin
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>

RLE	Relative Logarithmische Expression
RMA	<i>Robust Multi Array</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
sek	Sekunde
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
TOF	Flugzeitanalyse ( <i>Time of flight</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Units
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
vgl.	vergleiche
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
vs.	versus, lat. für gegen/gegenüber gestellt
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
WTA	Wandteichonsäure ( <i>wall teichoic acid</i> )
z. B.	zum Beispiel





## Zusammenfassung

Das opportunistisch pathogene Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist insbesondere in Krankenhäusern sowie in Alten- und Pflegeheimen ein Problemkeim. Die Nasenvorhöfe amtieren bei ca. zwei Dritteln der gesunden Bevölkerung vorübergehend oder persistent als natürliches Habitat. Die nasale Besiedlung bzw. die Adhäsion von *S. aureus* an die humane nasale Schleimhaut ist ein bekannter Risikofaktor für die Erkrankung an verschiedenen, mit diesem Pathogen assoziierten Infektionen. Die Inhibierung dieser Adhäsion mittels geeigneter Wirkstoffe stellt sich folglich als wertvoller, neuer pharmakologischer Ansatz dar.

In dieser Arbeit wurde ein hochdurchsatzfähiges Verfahren zur Quantifizierung adhärenter *S. aureus* an humanen Epithelzellen entwickelt und etabliert. Unter Anwendung dieses Testsystems wurden über 4000 Substanzen auf adhäsionsinhibitorische Wirkung getestet. Nach Identifizierung und Reevaluierung initialer Treffersubstanzen des Screenings wurden die aussichtsreichsten Kandidaten, Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin, mittels verschiedener Folgetests sowohl unter Anwendung der humanen pulmonalen Zelllinie A-549 als auch unter Verwendung humaner nasaler Primärzellen näher charakterisiert. Die Substanzen zeigten adhäsionsinhibierende Aktivitäten mit  $IC_{50}$ -Werten von 0,95  $\mu\text{g/ml}$  für Aurintricarbonsäure und 51  $\mu\text{M}$  für Pseudohypericin. Aurintricarbonsäure zeigte zudem die Eigenschaft, bei besiedelten Epithelzellen die Adhäsion von *S. aureus* zu reduzieren. In zellbasierten Toxizitätstests wurde eine 50 %ige Reduktion der Zellvitalität nach 24 h mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 370  $\mu\text{g/ml}$  für beide Substanzen nicht erreicht. Nach fünf Tagen wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 33  $\mu\text{g/ml}$  für Aurintricarbonsäure und 71  $\mu\text{M}$  für Pseudohypericin ermittelt. Beide Substanzen können als Leitstrukturen für eine Optimierung bezüglich der Aktivitäten und Toxizitäten dienen. Das etablierte Screeningverfahren kann für die weitere Testung von Substanzsammlungen und Bibliotheken angewendet werden.

Zusätzlich zu den Screening-Experimenten wurden in dieser Arbeit Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt. Diese sollten der Identifizierung von Sequenzen bzw. Aminosäureabfolgen von humanen Oberflächenproteinen dienen, welche für den nasalen Adhäsionsprozess essentiell sind. Für diesen Ansatz wurden die vier *S. aureus* Oberflächenproteine IsdA, ClfB, SdrC und SdrD rekombinant hergestellt und die drei ausgewählten humanen Proteine Cytokeratin 10, Involucrin und Loricrin des Nasenepithels, zerlegt in überlappende kurze Peptide, auf Cellulosemembranen erzeugt. Es konnten keine für den Adhäsionsprozess essentiellen Sequenzen mit diesem Verfahren identifiziert werden.

Darüber hinaus wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, um die Genexpression von *S. aureus* in den Kulturmedien BHI, LB, BM und einem artifiziellen nasalen Medium (ANM) zu verschiedenen Wachstumsphasen zu charakterisieren. Es wurde gezeigt, dass in ANM die Adhäsionsfaktoren am stärksten exprimiert wurden. Zudem lagen in ANM im Vergleich zum Medium BHI Virulenzfaktoren stark angereichert vor. Diese Daten schlagen ANM als gut geeignetes Medium für künftige Adhäsions- und Pathogenitätsstudien der Bakterien vor.



## Abstract

*Studies on Staphylococcus aureus mucosa colonization and the identification of adhesion inhibitors with a newly developed high throughput screening assay.*

The opportunistic pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a major problem especially in hospitals and nursing homes. In approximately two-thirds of the healthy population, the vestibules of the nose serve temporarily or persistently as natural habitat. The nasal colonization and accordingly the adhesion of *S. aureus* to the human nasal mucosa is a known risk factor for the development of various diseases associated with this pathogen. Consequently, the inhibition of this adhesion with suitable active components can be a valuable new pharmacologic approach.

In this thesis, a high throughput assay for the quantification of the adhesion of *S. aureus* to human epithelial cells was developed and established. By using this assay, over 4000 substances were tested for their anti-adhesive activity. After identifying and reevaluating initial hits in the screening, the two most promising candidates, aurintricarboxylic acid and pseudohypericin, were further characterized in follow-up experiments using the human pulmonary cell line A-549 as well as with human nasal primary cells. The substances showed anti-adhesive activities with  $IC_{50}$  values of 0,95  $\mu\text{g/ml}$  for aurintricarboxylic acid and 51  $\mu\text{M}$  for pseudohypericin. Aurintricarboxylic acid was also able to reduce the adherence on *S. aureus* precolonized epithelial cells. In cell based toxicity studies, a 50 % reduction of the cell vitality was not reached after 24 hours with a maximal concentration of 370  $\mu\text{g/ml}$  for both substances. After 5 days,  $IC_{50}$  values of 33  $\mu\text{g/ml}$  for aurintricarboxylic acid and 71  $\mu\text{M}$  for pseudohypericin were obtained. Both substances can serve as lead structures for optimizations concerning activities and toxicities. The established screening assay can be used for further investigations of substance collections and libraries.

In addition to the screening experiments, protein-protein interaction studies were performed in this thesis. The aim was the identification of amino acid sequences of human surface proteins which are essential for the nasal adhesion process. For this approach, the four *S. aureus* surface proteins IsdA, ClfB, SdrC and SdrD were recombinantly synthesized and the three selected human proteins cytokeratin 10, loricrin and involucrin of the nasal epithelium, fragmented in overlapping short peptides, were generated on cellulose membranes. No essential sequences for the adhesion process could be identified in this assay.

Furthermore, transcription analyses were performed to characterize the gene expression of *S. aureus* in the culture media BHI, LB, BM and an artificial nasal medium (ANM) at different growth phases. The highest expression of the adhesion factors was found for ANM. In addition, virulence factors were strongly enriched in ANM compared to the medium BHI. These data suggest ANM as a highly suitable culture medium for future studies concerning adhesion and pathogenicity of the bacteria.

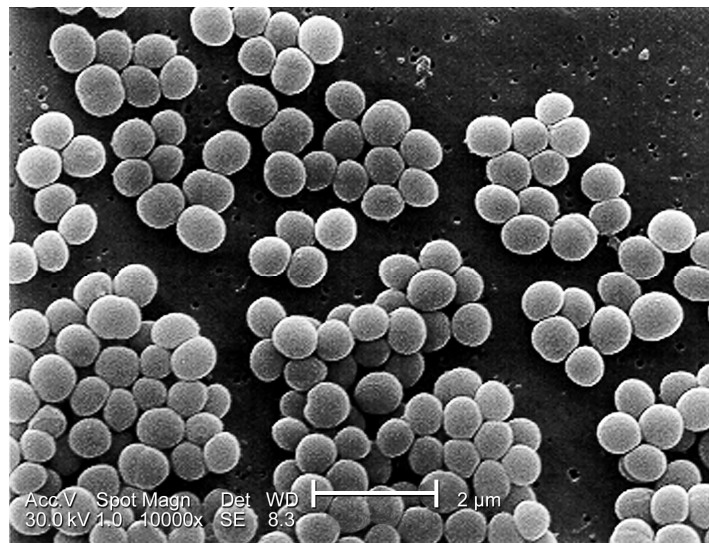


# 1 Einleitung

## 1.1 Mikrobiologischer und medizinischer Hintergrund

### 1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Bei dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) handelt es sich um eine unbewegliche, rundliche, nicht-sporulierende Kokke. Optisch charakteristisch für die Koloniemorphologie dieser Bakterien ist die weintraubenähnliche Zusammenlagerung (siehe Abbildung 1-1). Der Name „aureus“ (lat.: „golden“) lässt sich auf die gelb-golden schimmernde Oberfläche des Bakteriums zurückführen, die auf der Existenz von Carotinoiden an der Zelloberfläche beruht. Diese erhöhen die Pathogenität des Bakteriums, indem sie antioxidativ wirken und den Zelltod von Neutrophilen herbeiführen können (Liu *et al.*, 2005). *S. aureus* gehört zu der Gattung *Staphylococcus* und ist 0,8-1,2 µm groß. Als Koagulase-positive Kokke ist das Bakterium in der Lage, eine Gerinnung von Fibrinogen herbeizuführen, was einen von vielen Pathogenitätsfaktoren darstellt.



**Abbildung 1-1: *Staphylococcus aureus***

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Quelle: CDC/ Matthew J. Arduino, DRPH; Photo Credit: CDC/Janice Haney Carr).

*S. aureus* ist fast überall in der Natur zu finden und kann als Teil der mikrobiellen Flora Haut und Schleimhäute von Menschen sowie Tieren besiedeln. Beim Menschen dienen die Nasenvorhöfe als bevorzugtes Areal (Shuter *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 2001). Menschen, bei denen das Bakterium nachzuweisen ist, werden als „Träger“ bezeichnet. Ungefähr 20 % der Bevölkerung tragen *S. aureus* persistent in den Nasenvorhöfen, ca. 60 % der Bevölkerung sind sporadische Träger und ca. 20 % werden fast nie besiedelt (Kluytmans *et al.*, 1997).

Sporadischer Träger zu sein bedeutet, dass die Nasenvorhöfe zeitweise besiedelt sind, zu einem späteren Zeitpunkt der Keim allerdings nicht mehr nachweisbar ist. Warum einige Menschen permanente, einige sporadische Träger sind und wiederum andere nie besiedelt werden, ist noch nicht eindeutig geklärt. Hinweise zum Einfluss genetischer Faktoren und des Immunsystems sind jedoch zu finden (Kinsman *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2001; van Belkum *et al.*, 2007). Als weitere Faktoren werden das Alter, die Anwendung von Antibiotika, Krankenhausaufenthalte sowie Erkrankungen angegeben (Casewell and Hill, 1986).

Neben den Nasenvorhöfen dienen auch andere Stellen des Körpers als Habitat, so kann man *S. aureus* bei einigen Menschen beispielsweise auch im Rachen, unter den Achseln oder in der Leistengegend nachweisen. Eine gesunde Person, die mit *S. aureus* besiedelt ist, zeigt keinerlei Symptome und ist meist unwissentlich Träger dieses Bakteriums. Gefährdet sind allerdings Träger, die ein geschwächtes Immunsystem haben, wie z. B. HIV-Patienten oder Menschen, denen nach einer Organtransplantation Immunsuppressiva verabreicht werden. Aber auch chronisch Kranke, ältere Menschen oder Personen, die operative Wunden aufweisen, haben bei Trägerschaft ein erhöhtes Potential, zu erkranken. Bei diesen Personen bzw. unter diesen besonderen Bedingungen kann der Patienten-eigene Keim eine Infektion auslösen (von Eiff *et al.*, 2001).

*S. aureus* kann aufgrund der Expression zahl- und facettenreicher Virulenzfaktoren verschiedenste Infektionen hervorrufen. So kann das Bakterium lokal-oberflächliche Hautinfektionen wie Furunkel und Entzündungen verursachen, aber auch Gastroenteritis, Harnwegsinfekte und Infektionen der oberen Atemwege auslösen. Entzündungen der Herzinnenhaut (Endokarditis) und systemische Infektionen, die in einer Sepsis resultieren, können ebenfalls durch *S. aureus* verursacht werden und haben ein besonders hohes Risiko, bei einer erfolglos verlaufenden pharmakologischen Therapie tödlich zu enden.

Im Folgenden sind einige Virulenzfaktoren benannt. Zum einen produziert *S. aureus* zahlreiche Faktoren, die es vor der Immunabwehr des Wirtes schützen. So ist das Bakterium zum Beispiel von einer Kapsel umgeben, die Schutz vor Phagozytose bietet (Lee *et al.*, 1987). Außerdem bildet es das Enzym Katalase, dass ein Überleben im Phagozyten begünstigt. Durch Produktion von Leukocidin ist es in der Lage, Leukozyten zu lysieren. Die Expression von Hämolysinen führt zur Hämolyse von Erythrozyten (Jonsson *et al.*, 1985); in der Laborpraxis ist diese Eigenschaft durch Ausstrich des *S. aureus*-Stammes auf Blutagarplatten und anschließender Bildung einer hellen Zone um die Kolonien herum, anschaulich zu demonstrieren. Die Bildung des Proteins A ist mit der Eigenschaft assoziiert, sich vor Phagozytose durch Makrophagen zu schützen (Forsgren *et al.*, 1971; Patel *et al.*, 1987). Protein A, auf der Zelloberfläche des Bakteriums lokalisiert, interagiert mit dem Fc-Fragment von Immunglobulinen und nicht mit den beiden Fragmenten der Antigenbindestellen (Fab-Fragmente). Dadurch werden die Bakterien nicht vom Immunsystem als Fremdmolekül erfasst.

Bei der Kolonisierung des Gewebes dienen dem Bakterium weitere Virulenzfaktoren als helfende Enzyme: Die Staphylokinase löst die durch Koagulase gebildeten Fibrin-Klumpen auf und ermöglicht so das Vordringen in tiefere Gewebeschichten. Mittels Expression von

Lipasen können Fette und Öle hydrolysiert werden, was die Kolonisierung von Talgdrüsen erleichtert (Smeltzer *et al.*, 1992). Die Zerstörung von Gewebeproteinen wird durch Bildung von Proteasen erleichtert. Der spezifische Abbau von Hyaluronsäure wird durch Synthese einer Hyaluronidase ermöglicht.

Einige Infektionen werden durch Abgabe spezieller Exotoxine hervorgerufen. Das „Syndrom der verbrühten Haut“ (SSSS = *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*) war lange Zeit besonders auf Säuglingsstationen stark gefürchtet, tritt aber heutzutage nur noch selten auf. Bei dieser systemischen Erkrankung verursacht *S. aureus* durch Ausschüttung der Exfoliatine A und B eine Blasenbildung der Haut mit folgender z. T. großflächiger Hautablösung. Die Exfoliatine wirken als Serinproteasen und führen zur Aufspaltung des Haftproteins Desmoglein 1 innerhalb der Desmosomen, was zu einer Auflockerung der Zellverbände mit anschließender Ablösung der Haut führt.

Das Toxische Schocksyndrom, hervorgerufen durch das TSST (*Toxic Shock Syndrome Toxin*) tritt klassischerweise mit der Benutzung von Tampons auf. Die in den Körper eingebrachten Bakterien lösen durch Ausschüttung dieser Exotoxine schwere Kreislauf- und Organversagen aus.

Die Aufnahme von mit *S. aureus* kontaminierten Lebensmitteln kann eine Gastroenteritis auslösen, welche durch die Sekretion von Enterotoxinen vermittelt wird (Casman and Bennett, 1965; Jones and Khan, 1986).

### 1.1.2 MRSA

Die Bezeichnung MRSA steht für Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*. Das Antibiotikum Methicillin sowie dessen Derivat Oxacillin gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, welche strukturell auf Penicillin zurückgehen. Methicillin gehört zu den Penicillinase-festen Penicillinen, was bedeutet, dass dieses Antibiotikum durch das von den Bakterien exprimierte Enzym Penicillinase nicht in seiner Wirksamkeit beeinflusst wird. Penicillinase spaltet den  $\beta$ -Lactam-Ring von Penicillin und dessen Derivaten.

Alle *S. aureus* Stämme exprimieren das sogenannte "Penicillin-Bindeprotein". Dabei handelt es sich um eine Transpeptidase, die die Quervernetzung benachbarter Pentapeptidketten der Proteoglykane in der Zellwand bewirkt.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wirken, indem sie als Bausteine bei der Zellwandbiosynthese von dem Penicillin-Bindeprotein eingesetzt werden. Durch die Struktur dieser „falschen“ Bausteine wird verhindert, dass die Zellwandbiosynthese an dieser Stelle fortgesetzt werden kann.

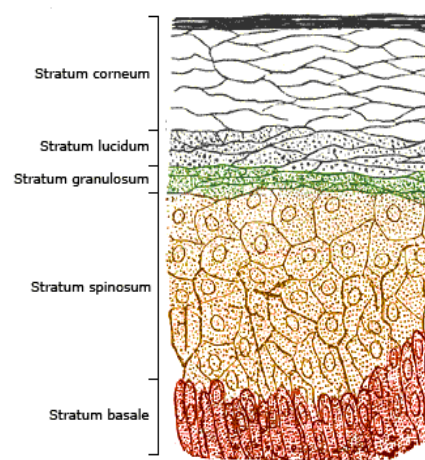
MRSA-Stämme weisen das Resistenzgen *mecA* auf, welches für ein modifiziertes Penicillin-Bindeprotein (PBP2a, syn. PBB2') kodiert. Dieses modifizierte Penicillin-Bindeprotein hat eine verminderte Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und baut diese folglich nicht in die Zellwand ein. Dies führt dazu, dass MRSA gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme) resistent ist.

Eine MRSA-Infektion ist im Vergleich zu einer MSSA-Infektion (Methicillin-sensitiver *S. aureus*) assoziiert mit einer höheren Krankheits- und Sterblichkeitsrate (Blot *et al.*, 2002; Cosgrove *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Biologie der nasalen Adhäsion

*S. aureus* lässt sich bei ca. 20 % der Bevölkerung persistent auf den Schleimhäuten der Nasenvorhöfe nachweisen (Kluytmans *et al.*, 1997). Welche zellulären Faktoren bei dieser Besiedlung, sowohl ausgehend vom Bakterium als auch vom Epithel des Wirtes, eine essentielle Bedeutung haben, ist bisher nur ansatzweise geklärt.

Abbildung 1-2 zeigt einen schematischen Überblick über den zellulären Aufbau der menschlichen Epidermis.



**Abbildung 1-2: Zellschichten menschlicher Epidermis (Quelle Wikipedia: frei verfügbar)**

In der untersten Schicht, dem *Stratum basale*, befinden sich die Keratinozyten, welche einen Zellkern aufweisen und teilungsfähig sind. In ihrem Differenzierungsprozess durchlaufen sie verschiedene Stadien und erreichen schließlich die äußerste Schicht, das *Stratum corneum*. Die Korneozyten des *Stratum corneum* weisen keinen Zellkern auf, sind flach, nicht mehr teilungsfähig und haben einen sehr hohen Keratingehalt. Der Differenzierungsprozess dauert ca. zwei bis vier Wochen.

Bibel postulierte bereits im Jahre 1982, dass *S. aureus* insbesondere die Korneozyten des *Stratum corneum* besiedelt und zeigte mittels Adhäsionsstudien, dass die Anzahl adhärenter *S. aureus* proportional zum Keratinisierungsstadium der epidermalen Zellen ist (Bibel *et al.*, 1982).

Die keratinreichen Korneozyten des Stratum corneum sind von einer ca. 15 nm dicken, proteinreichen Schicht umgeben. Verschiedene Bestandteile dieser Schicht können als adhäsionsvermittelnde Interaktionspartner für *S. aureus* fungieren: Als Hauptbestandteil dieser Schicht konnte Loricrin nachgewiesen werden (65-70% w/w) (Hohl *et al.*, 1991), außerdem wurde mit einem Gesamtanteil von 5 % (w/w) Involucrin ermittelt (Steinert and Marekov, 1997). Als weiterer potentieller Ligand wurde Cytokeratin 10 auf der Zelloberfläche von Korneozyten detektiert (O'Brien *et al.*, 2002).



Die Durchführung verschiedener Adhäsionsexperimente ließ Adhäsionsfaktoren von *S. aureus* identifizieren, die für den nasalen Interaktionsprozess essentiell sind. Das *S. aureus* Oberflächenprotein IsdA (Iron-regulated surface determinant protein A) zeigte sowohl eine Bindung an Loricrin und Involucrin als auch an Cytokeratin 10 (Clarke *et al.*, 2009). Ebenfalls in einer Publikation aus dem Jahr 2009 wurden vier Oberflächenproteine von *S. aureus* beschrieben, die die Adhäsion an verhornte nasale Epidermalzellen fördern: Das bereits erwähnte IsdA sowie ClfB (Clumping factor B), SdrC und SdrD (Serine-aspartic acid repeat protein C und D) (Corrigan *et al.*, 2009). Bereits einige Jahre zuvor wurde nachgewiesen, dass ClfB an Cytokeratin 10 bindet (O'Brien *et al.*, 2002). Mittels Herstellung verkürzter Varianten des Cytokeratin 10 konnte ermittelt werden, dass ClfB an die C-terminale Glycin/Serin-reiche Region des Cytokeratin 10 bindet (Walsh *et al.*, 2004).

Einer weiteren Struktur auf der Oberfläche von *S. aureus* wurde eine entscheidende Bedeutung im nasalen Adhäsionsprozess zugeschrieben: der Wandteichonsäure (Weidenmaier *et al.*, 2004; Burian *et al.*, 2010). Die Adhäsion an nasale Zellen einer *S. aureus*-Mutante, die keine Wandteichonsäure exprimieren kann, war im Vergleich zum Wildtyp stark herabgesetzt (Weidenmaier *et al.*, 2004). Wandteichonsäure-abhängige Bindungen konnten durch die Zugabe des polyanionischen Liganden Polyinosinsäure inhibiert werden, was darauf hinweist, dass möglicherweise Scavenger-Rezeptor-ähnliche Moleküle an der Oberfläche der Epithelzellen eine Bindung mit der polyanionischen Wandteichonsäure vermitteln (Weidenmaier *et al.*, 2008). Scavenger-Rezeptoren gehören zu einer Gruppe von Rezeptoren, die Pathogene anhand von charakteristischen Strukturmotiven oder Molekülen erkennen. Die meisten der bekannten Scavenger-Rezeptoren kommen an den Oberflächen von Makrophagen und Endothelzellen vor, während nur wenige wie z. B. SCARA5 an respiratorischen Epithelzellen gefunden wurden (Jiang *et al.*, 2006).

#### **1.1.4 Pharmakologische Möglichkeiten zur Behandlung bzw. Prävention von *S. aureus*-Infektionen**

##### *Behandlung von S. aureus-Infektionen*

Der Beginn der Antibiotika-Ära im oder kurz nach dem 2. Weltkrieg galt als Revolution in der Behandlung von Infektionskrankheiten. Die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming führte dazu, dass viele Infektionen, auch *S. aureus*-Infektionen, einfach behandelt werden konnten. Durch den verbreiteten Einsatz dieses und anderer Antibiotika wurden viele *S. aureus*-Stämme gegen Penicilline, Aminoglykoside, Tetrazykline oder Chloramphenicol resistent. Die Entwicklung penicillinase-fester (s. o.) Antibiotika (wie Methicillin, Oxacillin) in den frühen 1960er Jahren brachte wiederum eine starke Verbesserung, allerdings wurde der erste MRSA-Stamm bereits 1961 in England entdeckt. (Yamaguchi and Ohno, 1992).

Heutzutage produzieren alle bekannten *S. aureus* Stämme das Enzym Penicillinase und sind somit gegen die Penicilline der ersten Generation resistent. Stämme, die auch gegen Penicillinase-feste Antibiotika resistent sind, stellen insbesondere in Krankenhäusern (nosokomiale Infektionen) und Pflegeeinrichtung ein stetig wachsendes Problem dar (Blot *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2004). Bei MRSA-Infektionen ist das Antibiotikum Vancomycin meist

das Mittel der Wahl. Jedoch sind auch seit einigen Jahren Vancomycin-resistente Stämme bekannt. Der erste Vancomycin-resistente Stamm wurde in Japan im Jahre 1996 beschrieben (Hiramatsu *et al.*, 1997; Rep, 1997). Vancomycin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Glykopeptide. Es hemmt den Aufbau der bakteriellen Zellwand, indem es mit den D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen einen Komplex bildet. Damit blockiert es die Bausteine der Quervernetzung der Zellwand. Aufgrund dieser Instabilität kommt es zur Zelllyse des Bakteriums.

#### *Eradikation von S. aureus aus den Nasenvorhöfen*

Nach dem derzeitigen medizinischen Stand ist der Wirkstoff Mupirocin das Mittel der Wahl, um *S. aureus* zu eradizieren. Mupirocin wird in Form einer Salbe topisch appliziert. Bei diesem Antibiotikum handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt von *Pseudomonas fluorescens*. Mupirocin bindet selektiv an die bakterielle Isoleucyl-tRNA-Synthetase und verhindert dadurch die Einbindung von Isoleucin in bakterielle Proteine (Hughes and Mellows, 1980). Der Wirkstoff fungiert somit als Hemmstoff der bakteriellen Proteinsynthese und ist auch gut gegen MRSA-Stämme wirksam. Allerdings ist die Verabreichung von Mupirocin kontraindiziert bei Schwangeren und Kindern. Darüber hinaus wurden bereits vor einigen Jahren Mupirocin-resistente Stämme isoliert (Cookson, 1990; Gilbert *et al.*, 1993; Babu *et al.*, 2009), sodass das Auffinden neuer Wirkstoffe unerlässlich erscheint (Coates *et al.*, 2009). Antibiotika üben stets einen selektiven Druck auf die bakterielle Population aus, und je öfter und länger sie angewandt werden, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten von Resistenzen.

Die Eliminierung der Erreger aus den Nasenvorhöfen gilt als zentrale Aufgabe bei den Präventivmaßnahmen. Es wurde gezeigt, dass diese lokal begrenzte Eliminierung in einer anschließenden Reduzierung der Besiedlung anderer Körperstellen resultiert (Casewell and Hill, 1986; Reagan *et al.*, 1991; Doebbeling, 1994).

### **1.1.5 Der Umgang mit der *S. aureus*- und MRSA-Problematik**

Zahlreiche Forschungsprojekte beschäftigen sich mit dem Auffinden neuer oder alternativer Wirkstoffe zur Sanierung von *S. aureus*-Trägern und zur Behandlung von *S. aureus*-Infektionen.

Die Metalloendopeptidase Lysostaphin, sezerniert von *Staphylococcus simulans*, spaltet quervernetzende Pentaglycin-Brücken in den Zellwänden der Staphylokokken und wird in der Laborpraxis zur Zelllyse eingesetzt. Untersuchungen im Baumwollrattenmodell, in denen diese Peptidase eingesetzt wurde, zeigte eine vollständige Keimeliminierung aller besiedelten Nasen nach dreimaliger Gabe einer 0,5 %igen Creme (Kokai-Kun *et al.*, 2003). Allerdings sind auch Lysostaphin-resistente *S. aureus* Stämme isoliert worden (Climo *et al.*, 1998; Climo *et al.*, 2001). Der Resistenzmechanismus beruht bei den meisten Stämmen auf einer Mutation der Gene *femA* und *femB*, die für die Insertion des zweiten und dritten bzw. vierten und fünften Glycins bei der Synthese der Pentaglycin-Brücke essentiell sind. So resultieren Mutationen dieser Gene in der Synthese von Mono- oder Triglycinbrücken (Ehlert *et al.*, 1997; Stranden *et al.*, 1997).

Für den Extrakt des grünen Tees wurde eine antiadhäsive Wirkung bei der Besiedlung von Maus-Fibroblasten durch *S. aureus* gezeigt. Jedoch wurde durch die Behandlung mit grünem Tee-Extrakt nur eine Verringerung der Adhäsion und keine völlige Keimfreiheit aufgezeigt (Lee *et al.*, 2009).

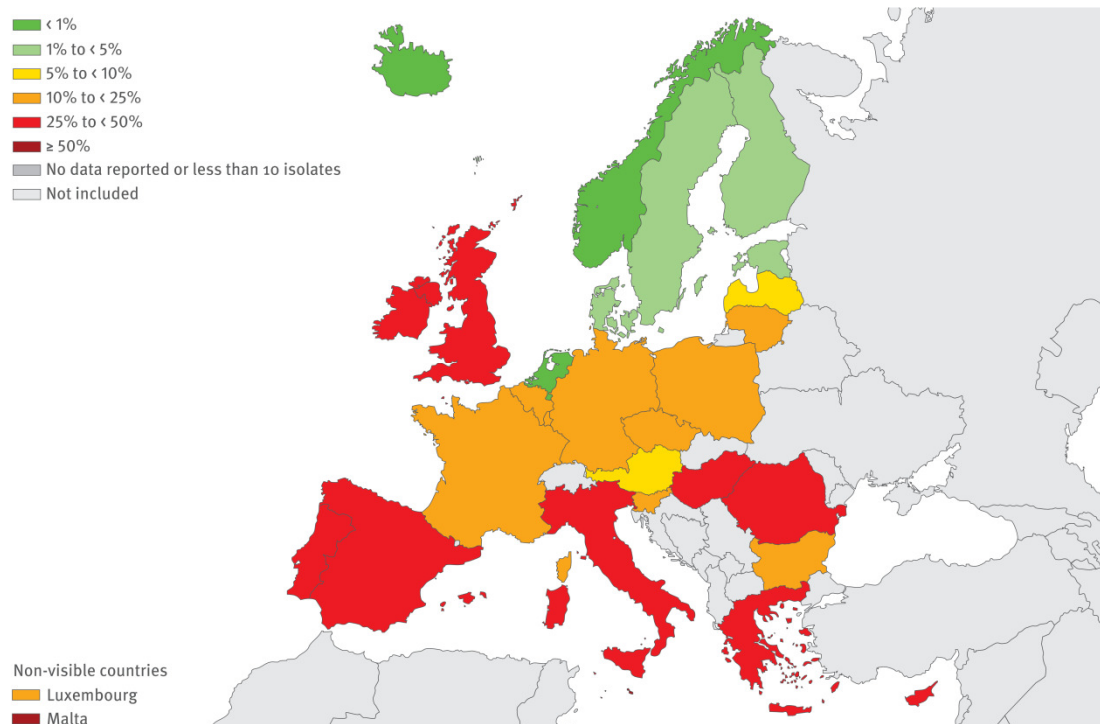
Studien zur Eradikation der Keime von besiedelten Körperregionen mittels Teebaumöl wiesen diesem Produkt eine *S. aureus* eliminierende Wirkung zu. Die Eradikation der Keime aus den Nasenvorhöfen mittels Mupirocin war in einer Vergleichsstudie allerdings signifikant effizienter als der Einsatz des Teebaumöls (78 % versus 47 %) (Dryden *et al.*, 2004), sodass diese Substanz derzeit noch keine Alternative zu Mupirocin bietet.

Neben den Bemühungen zur Auffindung neuer Wirkstoffe, die zur Eradikation eingesetzt werden könnten, belegen zahlreiche Studien, dass eine präventive Handlungsstrategie und insbesondere die Einhaltung von Hygienemaßnahmen ganz entscheidende Erfolge im Kampf gegen die *S. aureus*-Problematik erzielen (Gould *et al.*, 2007; van Rijen and Kluytmans, 2009; Bode *et al.*, 2010). Prävention in diesem Sinne kann zum einen bedeuten, Träger – insbesondere bei Einweisung in eine klinische Einrichtung – ausfindig zu machen und zu sanieren. Zum anderen kann dies bedeuten, im Vorhinein eine Trägerschaft bei Risikopatienten zu verhindern.

Die Trägerschaft oder auch Kolonisierung ist ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung von *S. aureus*-Infektionen, denn oftmals wird eine Erkrankung vom Träger-eigenen Stamm ausgelöst (von Eiff *et al.*, 2001). Dies erklärt auch die statistischen Erfassungen, die eine höhere Infektionsrate bei Trägern im Vergleich zu Nicht-Trägern aufzeigen und befürwortet Maßnahmen, bei denen Infektionen durch Eliminierung der nasalen Besiedlung verhindert werden (Yu *et al.*, 1986; Luzar *et al.*, 1990; von Eiff *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2004; Wertheim *et al.*, 2004).

Bei *S. aureus*-Infektionen stellen Stämme, die eine Resistenz gegen Methicillin aufweisen, eine besondere Problematik dar. Der Anteil der *S. aureus*-Infektionen, die von MRSA-Stämmen verursacht werden, variiert weltweit sehr stark. In den USA ist die MRSA-Rate bereits zwischen den Jahren 1975 und 1991 von 2,4 % auf 29 % gestiegen (Panlilio *et al.*, 1992). Im Jahre 2003 lag die Inzidenz von MRSA-Infektionen bei 64,4 % unter allen *S. aureus* Infektionen in U.S. amerikanischen Krankenhäusern (Klevens *et al.*, 2006).

Laut Angaben des „European Antimicrobial Resistance Surveillance Network“ (EARS-Net) liegen in den skandinavischen Ländern und in den Niederlanden im europaweiten Vergleich die niedrigsten MRSA-Raten vor – in den Niederlanden im Jahr 2009 unter 1% (siehe Abbildung 1-3). In Deutschland ist die MRSA-Rate in den letzten Jahren stark gestiegen, für das Jahr 2009 wurden bis zu 25 % innerhalb von Krankenhäusern gefunden (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: MRSA-Rate in Europa, 2009**

Dargestellt ist der Anteil an *S. aureus*-Isolaten in Krankenhäusern, die eine Methicillin-Resistenz (MRSA) aufweisen, Quelle: EARS-Net

Verschiedene Maßnahmen werden in Deutschland getroffen, um dieser Tendenz entgegen zu wirken, z. B. wurde 2009 die Aktion „saubere Hände“ in deutschen Krankenhäusern gestartet, die auf die Problematik der Verbreitung von Krankheitserregern über die Hände des Krankenhauspersonals aufmerksam machen und hier gezielt eingreifen soll (Chaberny *et al.*, 2009). Die Effizienz von routinemäßigen Screening-Maßnahmen ist umstritten. So postuliert das Robert-Koch-Institut, dass eine routinemäßige Untersuchung von Patienten oder medizinischem Personal auf MRSA nicht notwendig sei ([www.rki.de](http://www.rki.de), Information erfasst 12-2010), andere Studien stellen hingegen heraus, dass diese Maßnahmen sowohl die Kosten als auch die Infektionsrate senken würden (Bode *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Knausz *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010).

In den Niederlanden hingegen gelten bezüglich der MRSA-Verbreitung verschärfte Richtlinien. So regiert hier eine „Search and Destroy“ Politik, deren Inhalt in den nationalen Richtlinien der niederländischen „Working Party on Infection Prevention (WIP)“ festgehalten ist. Die Vorschriften beinhalten unter anderem, dass Risikopatienten vor Einweisung in ein Krankenhaus auf Trägerschaft getestet und solange isoliert behandelt werden, bis eine Nicht-Trägerschaft nachgewiesen oder der positiv getestete Träger erfolgreich saniert wurde. Auch wird nach Entlassung aus dem Krankenhaus in Kooperation mit den niedergelassenen Ärzten weiter kontrolliert, ob die Dekolonisierung erfolgreich bleibt bzw. es wird eine weitere Eradikation durchgeführt, falls der Patient bei der post-hospitalen Kontrolle positiv getestet wird. Dass die „Search and Destroy“ Politik erfolgreich ist wurde sowohl mittels Untersuchungen in niederländischen Krankenhäusern gezeigt (van Rijen and Kluytmans, 2009)

als auch anhand eines internationalen Projekts zwischen Deutschland und den Niederlanden bewiesen (Friedrich *et al.*, 2008). Hier zeigt eine grenzübergreifende Einhaltung der Richtlinien in der Region Twente/Münsterland bereits erste Erfolge (Zylka-Menhorn, 2010).

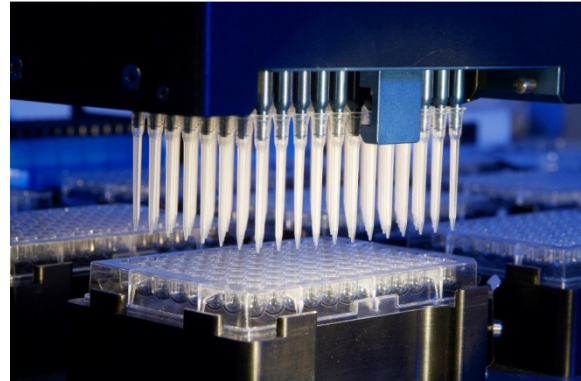
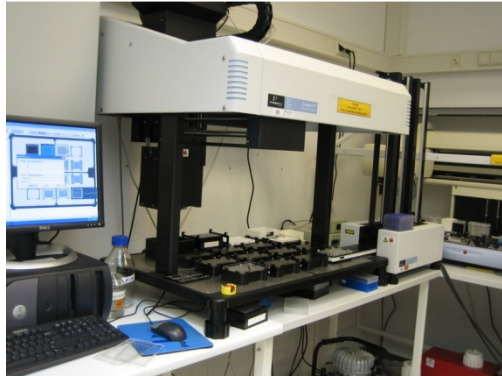
Am 9. Juni 2011 hat der deutsche Bundestag das Infektionsschutzänderungsgesetz beschlossen. Verschiedene Maßnahmen wurden mit diesem Gesetz festgelegt, die die Krankenhaushygiene verbessern und somit die Krankenhausinfektionen eindämmen sollen. So soll z. B. eine neue Kommission „Antiinfektiva, Resistenz und Therapie“ (ART) am Robert-Koch-Institut gegründet werden, die Empfehlungen mit allgemeinen Grundsätzen für Diagnostik und antimikrobielle Therapie für die verordnenden Ärzte erstellt (Osterloh, 2011). Leiter von Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen werden zudem zur Einhaltung der Empfehlungen der Kommission ART und der bereits beim RKI ansässigen Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) verpflichtet (Osterloh, 2011). Zudem soll eine Vergütungsregelung für die ambulante Therapie von Patienten, die mit MRSA infiziert sind, vereinbart werden (Osterloh, 2011).

## 1.2 Wirkstoffforschung mittels Hochdurchsatz-Screening-verfahren

Hochdurchsatz-Screeningverfahren haben in den letzten zwei Jahrzehnten eine bedeutsame Rolle bei der Identifizierung von Wirkstoffen eingenommen (Shun *et al.*, 2010). Mittels dieser Verfahren wird unter möglichst geringer Aufwendung von Kosten und Zeit eine große Anzahl von Substanzen parallel untersucht (Screening) und dabei werden Moleküle identifiziert (Hits), die im adressierten biologischen Kontext den gesuchten Wirkmechanismus erzielen. Die Bezeichnung „Hochdurchsatz-Screening (HTS)“ wird verwendet, wenn in einem Testverfahren mehrere tausend, meist mehrere zehntausend oder mehrere hunderttausend Substanzen untersucht werden. Die Bezeichnung definiert nicht per se, wie hoch der Durchsatz an Substanzen (pro Tag) ist. Insbesondere in der Pharmaindustrie werden durch entsprechende Automatisierungstechniken teilweise pro Tag einige 10.000 Verbindungen auf ihre Wirksamkeit getestet. Werden pro Tag mehr als 100.000 Substanzen getestet, wird auch der Begriff Ultra-Hochdurchsatz-Screening (uHTS) verwendet (Wunder *et al.*, 2008). 384-Well- und 1536-Well-Mikrotiterplatten fungieren als Basis zur Untersuchung solch großer Substanzmengen.

Je nach Anwendungsbereich und Fragestellung induzieren oder inhibieren die im Screening identifizierten Moleküle verschiedene Vorgänge, wie beispielsweise zellmorphologische Veränderungen (z. B. Tumor-Inhibitoren) oder das Auftreten bestimmter Interaktionen (z. B. Adhäsionsinhibitoren). Die Aussagen, die aus den Screeningverfahren über den Wirkmechanismus der Hits getroffen werden können, sind abhängig vom Versuchsaufbau. Durch einen entsprechenden Aufbau und methodischer Durchführung des Screening-Verfahrens ist es so auch möglich, einen bestimmten molekularen Prozess zu identifizieren, der von den Hit-Substanzen adressiert wird (Drew *et al.*, 2011; Fursov *et al.*, 2011; Istrate *et al.*, 2011). Ungefähr zwei Drittel der therapeutischen, molekularen Targets (Zielstrukturen) umfassen Enzyme und Rezeptoren (Zheng *et al.*, 2006).

Eine kostengünstige und beständige Durchführung von Screeningverfahren verlangt oftmals die Automatisierung des gesamten Prozesses oder zumindest einzelner Abläufe. Pipettierroboter (siehe Abbildung 1-4) und Mikrotiterplatten-Lesegeräte finden stets Einsatz bei Hochdurchsatz-Verfahren.



**Abbildung 1-4: Pipettierroboter Evolution P3 von Perkin Elmer**

*Die Ausstattung umfasst einen 96er Pipettierkopf, auf den ein Pintool aufgesetzt werden kann und einen Anwendungs-PC mit zugehöriger Software zur Programmierung und Steuerung des Roboters. Die Pipettierplattform weist 16 Positionen im Mikrotiterplattenformat auf, die vom Roboter angesteuert werden können.*

In dieser Arbeit wurde ein automatisches Mikroskop (ImageXpress Micro von Molecular Devices) zur Quantifizierung adhärenter *S. aureus* eingesetzt (siehe Abbildung 1-5). Automatische Mikroskope erlauben die Aufnahme von Bildern bei Untersuchungen im Mikrotiterplattenformat (Material auf Objektträgern kann jedoch bei Bedarf ebenfalls analysiert werden) mit anschließender Bildanalyse. Die Steuerung des Mikroskops sowie die Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgt mittels der zugehörigen Software.



**Abbildung 1-5: Automatisches Mikroskop ImageXpress Micro (IXM) von Molecular Devices**

*Die Ausstattung umfasst einen Anwendungs-PC mit zugehöriger Software zur Programmierung und Steuerung des IXM (nicht abgebildet). Ebenfalls nicht abgebildet: Externe Lichtquelle.*

Automatische/automatisierte Mikroskope finden vielfach Verwendung bei zellkulturbasierten High-Content-Analysen (HCA). Im Anwendungszentrum von High-Content-Analysen steht im Allgemeinen nicht der hohe Durchsatz, sondern ein hoher Informationsgehalt. Sie dienen zum Beispiel zur Identifizierung von Wirkmechanismen bisher unzureichend charakterisierter Wirkstoffkandidaten wie z.B. bestimmter Naturstoffe bzw. Naturstoffderivate (Diestel, 2010).

Nach Inkubation der zu untersuchenden Substanz mit adhären Zellen können mit Hilfe des automatischen Mikroskops und diverser Software-Module phänotypische Veränderungen aufgezeigt werden. Dazu werden die entsprechenden Morphologien durch Fluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht. Unter Anwendung bioinformatischer Analysen und unter Vergleich der so gewonnenen Daten mit Daten gut charakterisierter Substanzen gilt es, möglichst viele aufschlussreiche Informationen zu gewinnen.

### 1.2.1 Substanzsammlungen und Peptidbibliotheken

In der vorliegenden Arbeit wurden im Screeningverfahren Substanzsammlungen sowie Peptidbibliotheken getestet. Diese wurden vom HZI, Abteilung Chemische Biologie, zur Verfügung gestellt.

Unter den Substanzsammlungen wurde die NCH-, die Lopac- sowie die Var-Sammlung getestet. Die NCH-Sammlung besteht aus 117 Substanzen und war in der Abteilung Naturstoffbiologie des HZI im Rahmen von über viele Jahre durchgeführten Forschungsarbeiten aus Myxobakterien isoliert worden (Gerth *et al.*, 2003). Alle Substanzen dieser Sammlung sind Sekundärmetabolite aus Myxobakterien und demnach Substanzen, die nicht zum Wachstum oder Überleben der Organismen essentiell sind. Viele dieser Substanzen zeigen Wirkmechanismen, die bereits bei Inkubation mit kleinsten Mengen (pM und nM-Bereich) gezeigt werden konnten. Zum Beispiel zeigt Disorazol A<sub>1</sub> eine antimitotische und antimykotische Aktivität (Irschik *et al.*, 1995; Elnakady *et al.*, 2004). Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3 pM inhibiert Disorazol A<sub>1</sub> metabolische Aktivitäten von L-929-Zellen hoch effektiv (Elnakady *et al.*, 2004). Eine Erklärung für die hocheffektiven Aktivitätsbereiche ist mit dem Ursprung der Substanzen zu begründen, denn im Zuge natürlicher Selektion kann die Synthese biologisch aktiver Moleküle einzelnen Organismen einen Vorteil verschaffen (Evolution). Dabei ist eine Zunahme der Aktivität proportional zum evolutionären Vorteil. Für die Wirkstoffforschung ist die Untersuchung der Aktivitäten solcher Naturstoffe hochinteressant. Ein Beispiel für eine Substanz der NCH-Sammlung, die als Wirkstoff therapeutisch eingesetzt wird, ist das Epothilon, isoliert aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum*. Basierend auf Forschungsaktivitäten am HZI wurde ein Derivat des Epothilons 2007 in den USA als Antikrebsmittel unter dem Namen Ixempra auf den Markt gebracht (Höfle *et al.*, 1996; Höfle, 2009).

Die LOPAC-Sammlung („*Library of Pharmacologically Active Compounds*“) ist kommerziell bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erhältlich und besteht aus 1408 pharmakologisch aktiven Substanzen. Unter diesen befinden sich Substanzen, die als zugelassene Medikamente auf dem Markt sind oder im Rahmen von klinischen Studien evaluiert wurden. Verschiedene Wirkmechanismen/Targets werden mit den enthaltenen Substanzen adressiert wie Apoptose, Genregulierung & Expression, G-Proteine & zyklische Nukleotide oder Ionenkanäle.

Die Var-Sammlung ist wie die NCH-Sammlung einzigartig am HZI. Sie beinhaltet zahlreiche unterschiedliche Strukturen, die durch Kollaboration mit verschiedenen Synthese-Chemikern in die HZI-Substanzsammlung aufgenommen wurde. Die Abkürzung steht für „*VARious*

*sources*“. Die Sammlung enthält sowohl chemisch-synthetische Verbindungen als auch Naturstoffe, die aus Organismen wie Pilzen oder höheren Pflanzen isoliert wurden.

Peptidbibliotheken beinhalten im Gegensatz zu Substanzsammlungen eine Mischung von Peptiden mit gleicher Grundstruktur und gleicher Länge, aber zahlreichen Sequenzvariationen. Die Peptidbibliotheken, die in dieser Arbeit gescreent wurden, wurden durch chemische Synthese parallel erzeugt, eine molekularbiologische Generierung von Peptidbibliotheken ist ebenfalls möglich (Kügler *et al.*, 2008). Bei der chemischen Synthese werden die Anzahl der Bausteine (z. B. alle 20 kanonischen Aminosäuren), die Peptidlänge sowie die Konformation (linear oder zyklisch) festgelegt. Basierend auf dieser Festlegung können alle kombinatorisch möglichen Variationen synthetisiert werden. So ergeben sich beispielsweise bei Verwendung aller 20 Aminosäuren und nur einer kurzen Peptidlänge von drei Aminosäuren 8.000 Kombinationen ( $20^3$ ). Die Peptide, die in dieser Arbeit gescreent wurden, wiesen eine Länge von sieben bzw. acht Aminosäuren auf. Es waren jeweils die mittleren zwei Positionen definiert, sodass sich für diese definierten Positionen  $20^2 = 400$  Kombinationen ergaben. Da die anderen Positionen nicht definiert waren, ergab sich für jede der 400 Kombinationen eine Subbibliothek, bestehend aus einem Peptid-Gemisch diverser Abfolgen. Bei Testung solcher Bibliotheken im Screeningverfahren können die Varianten bzw. die Subbibliotheken mit der höchsten Aktivität identifiziert werden. Gegebenenfalls können dann weitere definierte Abfolgen der Subbibliotheken erstellt werden und somit die aktivste Variante systematisch identifiziert werden. Eine Identifizierung der Sequenz aktiver Peptide ist zudem durch Edman-Abbau möglich.

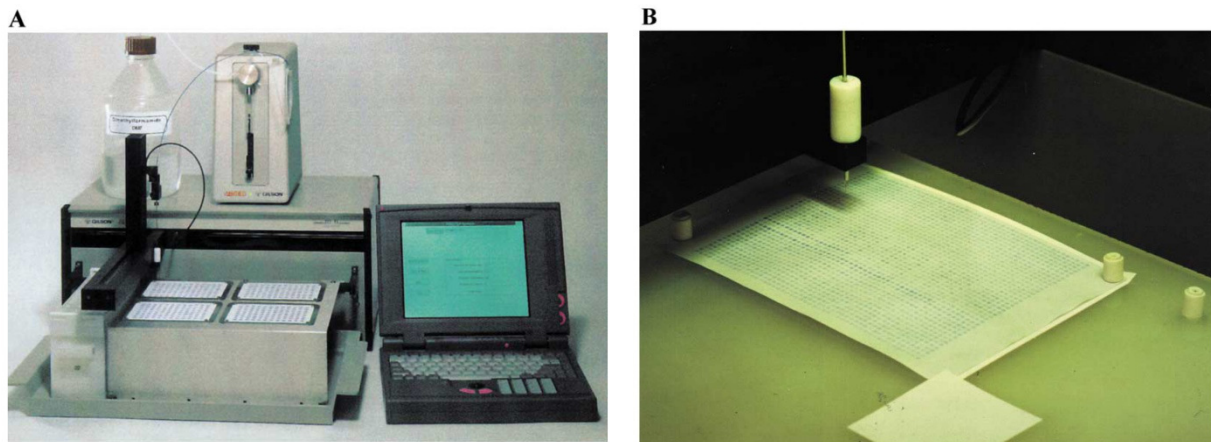
### 1.3 Cellulose-gebundene Peptidarrays

In der vorliegenden Arbeit wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien unter Einsatz Cellulose-gebundener Peptidarrays durchgeführt. Als Peptidarray wird ein Trägermaterial bezeichnet, an welchem eine große Anzahl von Peptiden immobilisiert vorliegt. Die Anzahl variiert hierbei je nach Anwendung. Die systematische Untersuchung einer großen Anzahl von kurzen Peptidsequenzen in einem geeigneten biologischen Testsystem ist ein leistungsstarkes Werkzeug bei der Erfassung von Protein-Protein-Interaktionen (Frank, 1992). Der Bindungsmechanismus zwischen Liganden und Proteinen wie Enzymen, Rezeptoren und Antikörpern kann auf molekularer Ebene studiert und neue biologisch aktive Sequenzen können identifiziert werden (Frank, 1992).

Die SPOT-Technik zur direkten Synthese von Peptiden auf porösen, flachen Oberflächen (Festphasensynthese) wurde von R. Frank und S. Güler entwickelt und 1990 auf dem 21. European Peptide Symposium erstmalig vorgestellt (Frank *et al.*, 1991) und patentiert (Frank and Güler, 1990). Als klassisches und am weitesten verbreitetes Trägermaterial dient Cellulose; die Synthese der einzelnen SPOTs auf Cellulose erfolgt an markierten Positionen. Die Methode wurde ausgearbeitet unter der simultanen parallelen Erzeugung von Peptidsequenzen im Maßstab von je 50 nmol und unter Anwendung konventioneller Fmoc/tBu-Chemie (Fields and Noble, 1990; Frank, 1992). Bereits 1991 war ein kommerzielles Kit für die manuelle SPOT-Synthese verfügbar (Cambridge Research Biochemicals (CRB, UK)) und im Jahr 1993 wurde ein teilautomatisierter SPOT-Generator



auf den Markt gebracht (ASP222 von ABIMED Analysen-Technik, Deutschland, siehe Abbildung 1-6).

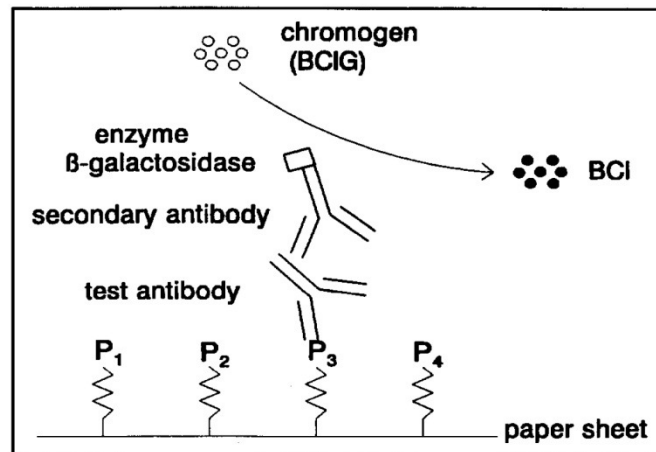


**Abbildung 1-6: Peptid-SPOT-Synthese auf Cellulosemembranen (Frank, 2002)**

*Gezeigt ist der ASP222 SPOT-Generator von ABIMED (A), der Peptide auf Cellulosemembranen erzeugt, welche jeweils die Größe einer Mikrotiterplatte haben (B).*

Peptid-SPOT-Membranen kommen in diversen Bindungsassays zum Einsatz, insbesondere bei immunologischen Fragestellungen. Mehr als 80 % der bis zum Jahr 2002 veröffentlichten Publikationen, welche den Einsatz dieser Technik implizierten, befassten sich mit immunologischen Epitop-Analysen (Frank, 2002).

Bei einem Epitop handelt es sich um eine Aminosäure-Sequenz, die von einem spezifischen Antikörper erkannt und als Interaktionsstelle genutzt wird. Peptid-SPOT-Membranen können zur Identifizierung von Epitopen eingesetzt werden, indem die Sequenz des zu untersuchenden Proteins in Form von überlappenden ca. 15 Aminosäuren langen Peptiden als SPOTs auf Cellulosemembranen erzeugt und diese Membran für einen Antikörper-Bindungsassay eingesetzt wird (siehe Abbildung 1-7). Der Ablauf stellt sich folgendermaßen dar: Die Cellulosemembranen werden mit dem Test-Antikörper inkubiert und die Interaktionsstelle des Test-Antikörpers mittels eines konjugierten sekundären Antikörpers detektiert. Als Konjugat kann beispielsweise das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase dienen, welches die Umsetzung verschiedener Substrate katalysiert. Abbildung 1-7 zeigt die katalytische Umsetzung des chromogenen Substrats BCIG (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, auch bekannt als X-Gal) zu Galaktose und BCI (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). BCI oxidiert zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo und ermöglicht im Bindungsassay so die Detektion des Antikörpers.



**Abbildung 1-7: Schematische Darstellung eines Antikörper-Bindungsassays unter Einsatz von Peptid-SPOT-Membranen (Frank, 1992)**

Mit solchen Antikörper-Bindungsassays wurden beispielsweise in Untersuchungen zum Hauptstrukturprotein p26 des viralen Erregers der „Equinen infektiösen Anämie“ (EIA) zwei Epitope unter Einsatz polyklonalen Pferdeserums identifiziert (Soutullo *et al.*, 2007). Studien bzgl. immunrelevanter Regionen des Enzyms Glyoxalase I ließen mittels dieser Methode drei Epitope identifizieren (Deswal *et al.*, 2005). Da eine veränderte Aktivität des Enzyms Glyoxalase I im direkten Zusammenhang mit dem Wachstum von Tumoren steht (Thornalley, 1990), ist die Identifizierung dieser Epitope zur Entwicklung von Tumor-Inhibitoren hilfreich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt, die eine molekulare Charakterisierung des nasalen Adhäsionsprozesses von *S. aureus* zum Ziel hatten. Es sollte der Möglichkeit nachgegangen werden, unter Anwendungen von SPOT-Membranen potentielle spezifische Sequenzen zu identifizieren, die essentiell für die Interaktionen zwischen *S. aureus* und humanen nasalen Zellen sind.

## 1.4 Transkriptomanalysen

Der erste Schritt im Infektionsprozess ist meist die Adhäsion des Pathogens an das Gewebe des Wirts. In diese initiale Interaktion sind biophysikalische und biochemische Prozesse zwischen den Zelloberflächen bzw. verschiedenen extrazellulären Oberflächenkomponenten involviert (van Belkum *et al.*, 2002). Die bakteriellen Faktoren werden oftmals als Adhäsine bezeichnet, die die Erkennung und die molekulare Interaktion mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen vermitteln (Soto and Hultgren, 1999).

Zahlreiche Adhäsine von *S. aureus* wurden identifiziert und mit Hilfe von Klonierungs- und Mutagenese-Techniken näher charakterisiert (Mempel *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 2002; Schaffer *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2009; Corrigan *et al.*, 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, um die Expression und die Regulation von *S. aureus* Adhäsionsfaktoren in Abhängigkeit des Nährstoffangebots und der Wachstumsphase genauer zu untersuchen.

Transkriptomanalysen unter Anwendung der Microarray-Technologie stellen ein wertvolles Werkzeug zur parallelen Erhebung des Expressionsprofils zahlreicher Gene dar. Ein

typischer DNA-Microarray enthält tausende Oligonukleotide („*probes*“), die das Genom des zu untersuchenden Organismus repräsentieren. Diese sind auf einem Trägermaterial (z. B. Glas) an definierten Positionen immobilisiert. Zur Charakterisierung des Genexpressionsprofils wird mRNA aus dem zu untersuchenden Organismus (bzw. aus den Zellen oder Geweben) extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Zur Detektion der cDNA wird diese markiert, wozu meist Fluoreszenzfarbstoffe (wie z. B. die Cyanin-Farbstoffe Cy3 und Cy5) dienen. Die markierte cDNA wird mit den Sonden auf dem Array hybridisiert. Nach Entfernung nicht-gebundener cDNA wird die Signalintensität der hybridisierten cDNA für jede Sonde ermittelt. Die Signalintensität ist proportional zur Menge exprimierter mRNA, sodass mittels des Vergleichs der Signale von cDNA unterschiedlicher Herkunft Aussagen über relative Unterschiede in der Genexpression getroffen werden können.

In dieser Arbeit wurden sogenannte Ein-Kanal-Microarrays von Affymetrix eingesetzt. Ein-Kanal-Microarrays erlauben den Vergleich zahlreicher Genexpressionsprofile untereinander, indem jeder Microarray genau einen Genexpressionszustand repräsentiert und in Relation mit den Daten anderer Microarrays gesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu wird bei Zwei-Kanal-Microarrays das Transkriptom von zwei unterschiedlichen Zuständen/Ursprüngen direkt auf dem Chip miteinander verglichen (z. B. gesundes Gewebe vs. malignes Gewebe), indem die cDNA mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert wird (Shalon *et al.*, 1996).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Substanzen, die die Schleimhautbesiedlung durch *Staphylococcus aureus* inhibieren. Um dieses Hauptziel zu erreichen, sollte zunächst ein Adhäsionsassay entwickelt und etabliert werden, der die Möglichkeit bietet, zahlreiche Substanzen im Hochdurchsatz-Verfahren zuverlässig auf ihre potentielle adhäsionsinhibitorische Eigenschaft zu testen. Unter Anwendung des entwickelten Adhäsionsassays sollten anschließend verschiedene Substanzsammlungen sowie Peptidbibliotheken gescreent werden. Identifizierte interessante Wirkstoffkandidaten sollten nachfolgend in weiterführenden Tests näher charakterisiert werden.

Protein-Protein-Interaktionsstudien sollten mit dem Ziel durchgeführt werden, für den *S. aureus* Interaktionsprozess essentielle Sequenzen humaner Oberflächenproteine zu identifizieren. Die Identifizierung solch spezifischer Sequenzen dient der Target-basierten Entwicklung von Inhibitoren der Schleimhautbesiedlung.

Transkriptomdaten sollten die Genexpression von *S. aureus* in verschiedenen Nährmedien sowie zu verschiedenen Wachstumsphasen näher charakterisieren. Ein besonderes Kriterium sollte hierbei die Untersuchung der Genexpression von Adhäsionsfaktoren sein. Diese Daten sollten so gleichzeitig der Wahl des optimalen Mediums sowie der optimalen Wachstumsphase für die Adhäsionsstudien dieser Arbeit sowie künftiger Studien dienen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2-1: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung, Hersteller und Firmensitz**

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller (Firmensitz)</b>
Autoklav	HST 4-5-6	Zirbus (Bad Grund)
Automatisches Mikroskop	ImageXpress Micro	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Bakterieninkubator	BE 50	Memmert (Schwabach)
Einkanal-Pipetten	Research und Reference	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophorese-Apparaturen	High Voltage Power Pack P30	Biometra (Göttingen)
	Fastblot B33 / B34	
	Blue Marine 100	Serva Elektrophoresis (Heidelberg)
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad (München)
Filmentwickler	Curix60	Agfa (Mortsel, Belgien)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplam	Zeiss (Oberkochen)
Gelgießkammer	Mini-Protean® System	BioRad (München)
HPLC-Geräte		Merck (Darmstadt)
Autosampler	L-7250	
Pumpe	L-7100	
Interface	D-7000	
Fraktionssammler	L-7650	
Laserscanner	Perfection V700 Photo	Epson (Tokyo, Japan)
Lichtmikroskop	Axiovert 35	Zeiss (Oberkochen)
Mehrkanal-Pipetten	Transferpette electronic	BRAND GmbH + CO KG (Wertheim)
Mikrowelle	NE-1 840	Panasonic (Osaka, Japan)
Multidispense-Pipette	Impact Multichannel	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
PCR-Cycler	PTC-200	MJ Research (Waltham, USA)
pH-Messgerät	pH-Meter CG 840	Schott (Mainz)
Photometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
	Ultraspec 2100 pro	Pharmacia (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller (Firmensitz)</b>
Pintool (zusammen mit Pipettierroboter eingesetzt)	FP3CB Pins: Floating Tube Pin - 0,787mm Durchmesser, 33 mm lang, Übertragungsvol. ca. 80 nl	V&P Scientific, Inc. (San Diego, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Pipettierroboter	Evolution P3	PerkinElmer (Waltham, USA)
Plattenmessgeräte	Wallac Victor 1420 Multilabel counter	PerkinElmer (Waltham, USA)
	Fusion Universal Microplate Analyser	PerkinElmer (Waltham, USA)
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore (Eschborn)
Schüttel- und Mischgerät	Duomax 1030	Heidolph (Schwabach)
Schüttelinkubator	Multitron	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Protean® Tetra Cell	BioRad (München)
Sterilwerkbänke	Herasafe KSP	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
	HBB2472S	Heraeus (Hanau)
	SterilGARD III Advance	Baker Company (Sanford, Maine, USA)
Thermomixer	comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank (-80)	Ultralow MDF-U50V	Sanyo (München)
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin (Berlin)
Vakuumabsaugpumpe	Vacusaft comfort	Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Vakuum-Zentrifuge	Univapo 150 H	UniEquip GmbH (Martinsried)
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York)
Waagen	Präzisionswaage L420S	Sartorius (Göttingen)
	R160P	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	SUB 14 mit Deckel Lu14	Grant (Shepreth, UK)
Zählkammer	Neubauer improved	Assistent (Sondheim)
Zellinkubator	CO2-Auto-Zero	Heraeus (Hanau)
	CO2 Air-Jacketed Incubator	Nuaire (Plymouth, USA)
Zentrifugen	Sorvall RC 5C Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
	5810R, 5418 und 5415R	Eppendorf (Hamburg)
	Megafuge 3.0 R	Heraeus (Hanau)
	Biofuge pico	Heraeus (Hanau)

## 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2-2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Lieferanten mit Firmensitz**

Produkt	Lieferant (Firmensitz)
Aurintricarbonsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
BenchMark™ His-tagged Protein Standard	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Bicinoic acid (BCA)-Proteintest	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD)	Roche Diagnostics (Risch, Schweiz)
GeneChip® <i>S. aureus</i> Genome Array	Affymetrix (High Wycombe, UK)
GeneRuler 1 kb Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler Express DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Glass beads acid-washed	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Immun-Star™ AP Substrate	BioRad (München)
Immun-Star™ Enhancer	BioRad (München)
Kodak® BioMax™ light film	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mikrotiterplatten: Polystyrol, 96 Wells pro Platte, schwarz, durchsichtiger Boden	Nalgene Nunc (Rochester, USA)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride) Tablet, 5 mg per tablet	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Polyinosinsäure (Poly(I))	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ProLong® Gold antifade reagent	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Rat tail collagen, type 1	BD Biosciences (Heidelberg)
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen (Hilden)
Sterilfilter	Sarstedt AG (Nümbrecht)
TMB "standard" solution	Interchim Bioscience Innovations (Montluçon, Frankreich)
TMB/HRP stop solution	Interchim Bioscience Innovations (Montluçon, Frankreich)
Western Blotting Detection Reagents 1+2	Amersham Bioscience (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)
Zip Tip µZipTip (C18)	Millipore (Eschborn)

## 2.1.3 Kits

**Tabelle 2-3: Kits unter Angabe des Lieferanten (bzw. der Bezugsquelle) mit Firmensitz**

Name des Kits	Lieferant
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
PCR-Produkt Reinigungskit	Qiagen (Hilden)

Name des Kits	Lieferant
Plasmid-DNA Extraktionskit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase-Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy Kit	Qiagen (Hilden)

### 2.1.4 Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Alexis Biochemicals, Becton Dickinson, Fluka, Gibco, Invitrogen, J.T. Baker, Merck, Oxoid, Riedel-de-Häen, Roche Diagnostics, Roth oder Sigma bezogen.

### 2.1.5 Antikörper und Farbstoffe

**Tabelle 2-4: Antikörper bzw. Farbstoff mit Lieferant**

Antikörper bzw. Farbstoff	Lieferant
AK gegen Lipoteichonsäure (LTA) von <i>S. aureus</i> (aus Kaninchen)	Acris Antibodies GmbH (Herford)
Alexa Fluor® 488 AK anti-Kaninchen (aus Maus)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Alexa Fluor® 488 AK anti-Maus (aus Ziege)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Anti-His-AK (aus Maus)	Merck (Darmstadt)
Anti-T7-AK (aus Maus)	Abcam (Cambridge, UK)
AP (Alkalische Phosphatase) konjugierter AK anti-Maus (aus Ziege)	Calbiochem, Merck (Darmstadt)
AP (Alkalische Phosphatase) konjugierter AK anti-Maus (aus Ziege)	Dianova (Hamburg)
CellTracker™ Red CMPTX	Molecular Probes®, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dapi (4',6 Diamidino-2-phenylindol) dihydrochloride	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)	Merck (Darmstadt)
Höchst 33342	Invitrogen (Carlsbad, USA)
HRP konjugierter AK anti-Kaninchen (aus Ziege)	Dianova (Hamburg)
HRP konjugierter AK anti-Kaninchen (aus Ziege)	Acris Antibodies GmbH (Herford)
Syto 9 aus Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit	Molecular Probes®, Invitrogen (Carlsbad, USA)
T7-Tag Antibody AP Conjugate	Merck (Darmstadt)

### 2.1.6 Kulturmedien

Zur Kultivierung von *S. aureus* wurden verschiedene Medien eingesetzt, die alle in Tabelle 2-5 zu finden sind.



**Tabelle 2-5: Medien für die Kultivierung von *S. aureus* und *E. coli***

Medium	Komponenten/Hersteller
ANM (Artifizielles Nasales Medium)	entwickelt und zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Peschel, Universität Tübingen
BHI (Brain Heart Infusion)	pH 7,4; 37 g/l (Firma Oxoid, Cambridge, UK)
BM	LB mit Zugabe von 0,1 % Glucose und 0,1 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Columbia Agar mit 5 % Schafsblut	Kommerziell bezogen von BD Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
LB (Luria-Bertani)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl

Alle Medienkomponenten wurden in deionisiertem Wasser gelöst und autoklaviert bzw. steril filtriert. Festen Medien wurden jeweils 15 g Agar pro Liter Medium zugesetzt.

Kanamycin wurde in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben. Festen Medien wurden diese Antibiotika direkt vor Gießen der Agarplatten bei einer Temperatur von ≤ 50 °C zugesetzt.

Folgende Zellkulturmedien wurden verwendet:

**Tabelle 2-6: Zellkulturmedien mit Firma und zugegebenen Komponenten**

Medium	Firma (Firmensitz)	Zugabe
Airway epithelial cell growth medium, serumfrei	Provitro GmbH (Berlin)	mitgelieferte Supplemente
DMEM	Lonza (Basel, Schweiz)	10 % FBS (Gibco®, Invitrogen)
Gibco® RPMI 1640	Invitrogen (Carlsbad, USA)	10 % FBS (Gibco®, Invitrogen)
Gibco® RPMI 1640 Infektionsmedium, pH 7,4	Invitrogen (Carlsbad, USA)	1 % FBS (Gibco®, Invitrogen), 20 mM Hepes

## 2.1.7 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2-7: Puffer und Lösungen**

Puffer bzw. Lösung	Rezeptur bzw. Firma
10 X Blockingbuffer (Stammlösung für Interaktionsstudien)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Blockierungspuffer pH 7,0 (Zusammensetzung für Einsatz in Interaktionsstudien)	10 ml: 2 ml 10 X Genosys Blockingbuffer (Sigma-Genosys); 8 ml T-TBS (pH 8,0); 0,5 g Saccharose
Blockierungspuffer pH 7,6 (Zusammensetzung für Einsatz in Interaktionsstudien)	10 ml: 2 ml 10 X Blockingbuffer (Sigma-Aldrich); 8 ml T-TBS (pH 8,0); 0,5 g Saccharose
Blot-Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % Methanol; 0,1 % SDS
Coomassie-Färbelösung (SDS-PAGE)	0,1 % Coomassie R250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol

Puffer bzw. Lösung	Rezeptur bzw. Firma
EBSS (Zellkultur)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Elutionspuffer (für die Proteinaufreinigung)	Lysepuffer + 250 mM Imidazol
Entfärbelösung (SDS-PAGE)	25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure
Genosys Blockingbuffer 10 X (Stammlösung für Interaktionsstudien)	Sigma-Genosys (St. Louis, USA)
Laufpuffer für die SDS-PAGE	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Lysepuffer	pH 7,5; 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	pH 7,4; 150 mM NaCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure
Puffer A (Peptid-Mapping)	pH 7,0; 8 M Harnstoff, 1 % SDS, 0,5 % Mercaptoethanol
Puffer B (Peptid-Mapping)	10 % Essigsäure, 50 % Ethanol
Puffer P1 (Qiagen, Hilden) (zur Isolierung chromosomaler DNA)	Angaben für 1 Liter: 6,06 g Tris-Base und 3,72 g Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O pH 8,0 100 mg RNase A zugeben, nach Zugabe von RNase A: Lagerung bei 4 °C
TAE (50X)	2 M Tris, 0,05 % Essigsäure, 0,05 M EDTA
TBS	pH 7,4 und pH 7,0; 100 mM Tris, 1,5 M NaCl
TBS-T	TBS + 0,05 % Tween 20, pH 7,0
Waschpuffer I – III (für die Proteinaufreinigung)	Lysepuffer + 10 mM Imidazol (I) bzw, 20 mM (II) bzw. 50 mM (III) Imidazol

## 2.1.8 Mikroorganismen und Zellkulturen

Folgende Zelllinien wurden eingesetzt:

**Tabelle 2-8: Zelllinien**

Ursprung				
Zelllinie	Quelle	Spezies	Gewebe	Art
A-549	DSMZ ACC107	Mensch	Lungenkarzinom	Epithel
HNEPC	Provitro GmbH (Berlin)	Mensch	Nasenschleimhaut	Epithel

Die verwendeten *S. aureus*-Stämme sind in Tabelle 2-9 aufgeführt.

Tabelle 2-9: *S. aureus*-Stämme

Bezeichnung	Eigenschaften/ Beschreibung	Quelle (erhalten von)
N315	MRSA, Isolat aus Japan 1982, komplett sequenziert	Prof. Dr. K. Becker, Universität Münster
SA113	ATCC-Nr.: 35556, restriktions-defizienter Stamm abgeleitet von Stamm NCTC 8325	Prof. Dr. F. Götz, Universität Tübingen
SA113 $\Delta tagO$	Fehlende Wandteichonsäure-Synthese	Prof. Dr. A. Peschel, Universität Tübingen
SA113 $\Delta srtA$	Sortase-defiziente Mutante	Prof. A. Peschel, Universität Tübingen
BH30 (04)	MRSA clinical isolate; biofilm positive; SCCmec type II; MLST type 8; CC8	Dr. James P. O’Gara, University College Dublin
BH30 (04) <i>spa</i>	Tetrazyklin-resistent	Dr. James P. O’Gara, University College Dublin
50307270	Rifampicin-resistentes Isolat	Klinikum Braunschweig, IMIK*
50128509	MRSA-Isolat	Klinikum Braunschweig, IMIK*
50046981	MSSA-Isolat	Klinikum Braunschweig, IMIK*

\*IMIK = Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Krankenhaushygiene

Für die Klonierungsarbeiten wurden die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  und BL21 (DE3) verwendet.

### 2.1.9 Testsubstanzen

*Sekundärmetabolite aus Myxobakterien (NCH-Sammlung):* Die in dieser Arbeit eingesetzten 117 Substanzen waren in der Abteilung Naturstoffbiologie des HZI im Rahmen von über viele Jahre durchgeführten Forschungsarbeiten aus Myxobakterien isoliert worden (Gerth *et al.*, 2003). Sie lagen als 2 mM Stammlösungen in DMSO in zwei 96-Well Polypropylen-Mikrotiterplatten vor.

*Peptidbibliotheken:* Die drei im Folgenden aufgeführten Peptidbibliotheken bestanden jeweils aus 361 Subbibliotheken mit jeweils definierten Aminosäuren an den Positionen „1“ und „2“. Sie waren in der Abteilung Chemische Biologie des HZI im Rahmen von Forschungsprojekten durch chemische Synthesen erzeugt worden. Die Strukturen sind in Tabelle 2-10 aufgeführt. Die Positionen „X“ sind jeweils nicht definiert und enthalten alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein, sodass jede Subbibliothek folglich ein Peptid-Gemisch diverser Abfolgen enthält. Die linearen Peptiden tragen einheitlich C-terminal den Diketopiperazin-Heterozyklus (DKP) als Kondensationsprodukt der Aminosäuren Lysin und Prolin. Die Peptide lagen in einem 2-Propanol/H<sub>2</sub>O Gemisch (1:1) in jeweils vier 96-Deepwell-Polypropylenplatten vor.

**Tabelle 2-10: Peptidbibliotheken**

<b>Peptidbibliothek</b>	<b>Konzentration der Stammlösungen</b>
Lineare Peptide mit der Struktur X-X-X-1-2-X-X-X-DKP aus L-Aminosäuren	4,0 mM
Lineare Peptide mit der Struktur X-X-X-1-2-X-X-X-DKP aus D-Aminosäuren	2,2 mM
Zyklische Peptide mit der Struktur [a-a-1-2-a-a-c] aus D-Aminosäuren	3,5 mM

*LOPAC-Sammlung:* Diese Sammlung ist kommerziell bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erhältlich und besteht aus 1408 pharmakologisch aktiven Substanzen. Die Konzentration der Stammlösungen lag bei 10 mM in DMSO, diese Stammlösungen befanden sich in vier 384-Polypropylen-Mikrotiterplatten.

*Var-Sammlung:* Die Sammlung beinhaltet zahlreiche unterschiedliche Strukturen, die durch Kollaboration mit verschiedenen Synthese-Chemikern in die HZI-Substanzsammlung aufgenommen wurde. Zur Zeit der Screening-Experimente dieser Arbeit standen ca. 1600 Substanzen in dieser Bibliothek zur Verfügung. Die Stammlösungen wiesen eine Konzentration von 5 mM in DMSO auf, mit Ausnahme von Screeningplatte 1, in der Konzentrationen von 1,0 mg/ml und 1,3 mM vorlagen. Alle Substanzen dieser Sammlung befanden sich in 96-Well-Polypropylenplatten.

Weitere Informationen zu den Sammlungen unter 1.2.1.

### 2.1.10 Primer

Die *in silico* erstellten Primer zur DNA-Synthese für die rekombinante Proteinsynthese wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert.

**Tabelle 2-11: Primer**

<b>Oligoname</b>	<b>Sequenz (5' → 3') bzw. Firma</b>
IsdA_for	TATCGGCCGCAATGGCAACAGAAGCTACG
IsdA_rev	GGCCTCGAGTTCTTTAGCTTTAGATGCT
ClfB_for	TATCGGCCGCAATGTCAGAACAAATCGAAC
ClfB_rev	GGCCTCGAGAGCATCAGTTTTGTGTTGT
SdrC_for	TATCGGCCGCAATGGCAGAACATACGAAT
SdrC_rev	GGCCTCGAGTGCTTTAGCTGTTTTATGC
SdrD_for	TATCGGCCGCAATGTTAGTAGGTACAACA
SdrD_rev	GGCCTCGAGTGCTTTTGCTTTATTGTGA
T7-Promoter Primer	Novagen (Merck, Darmstadt)
T7-Terminator Primer	Novagen (Merck, Darmstadt)

### 2.1.11 Expressionsvektor

Für die Expression wurde der Vektor pET-33b(+) von Novagen (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

### 2.1.12 Enzyme

**Tabelle 2-12: Enzyme**

Enzym-Bezeichnung	Firma
Lysostaphin	Dr. Petry Genmedics GmbH (Reutlingen)
Restriktionsenzym Eco521	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzym XhoI	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase (aus <i>E. coli</i> NM 989 acc. to Murray)	Roche Diagnostics (Risch, Schweiz)

### 2.1.13 Software

**Tabelle 2-13: Software**

Software	Verwendungszweck
AxioVision 3.1	Erstellung von Bildern mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan von Zeiss
CorelChart Version 5.0	zweidimensionale Farbintensitäts-Darstellung („Thermogramm“) der Adhäsionswerte (Teil des Programmpakets Corel Draw bis zur Version 5)
MetaXpress	Software zur Bedienung des IXM und zur Bildanalyse
Microsoft Office Excel 2003 und 2007	Graphische Darstellung der Adhäsionswerte und der MTT-Tests Auswertung und Darstellung der Daten, die mittels des Transfluor-Moduls von MetaXpress erstellt wurden
Vector NTI®	Erstellung und Überprüfung der Klonierungsstrategie

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 2.2.1.1 Kultivierung

Für die Standardkultivierung von *S. aureus* auf festem Medium wurden Blutagarplatten (siehe 2.1.6) eingesetzt.

Für die Durchführung des Adhäsionsassays wurde *S. aureus* in Flüssigmedium angezogen. Dazu wurden 5 ml Vollmedium (BM oder BHI) mit einigen Kolonien einer bewachsenen Blutagarplatte beimpft und ü. N. bei 37 °C geschüttelt.

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wurden zunächst Vorkulturen hergestellt, indem jeweils 5 ml Flüssigmedium (BHI, BM, LB oder ANM) mit einigen *S. aureus*-Kolonien beimpft und ü. N. bei 37 °C geschüttelt wurden. Mit diesen Vorkulturen wurden dann Hauptkulturen (BHI, BM, LB oder ANM) so angeimpft, dass eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,05 vorlag.

*E. coli* wurde in bzw. auf LB-Medium kultiviert, gegebenenfalls mit Zusatz von Antibiotika (siehe 2.1.6).

### 2.2.1.2 Lagerung

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 850 µl einer stationären LB-Kultur (24 h, 37 °C, 200 rpm) mit 150 µl sterilem, 100 %igem Glycerin gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.1.3 KBE-Bestimmung

Für die KBE-Bestimmung (Kolonie bildende Einheiten) wurden die Bakteriensuspensionen mittels Verdünnungsreihen dezimal maximal bis 10<sup>-12</sup> verdünnt. Von den so angefertigten Verdünnungen wurden jeweils 100 µl auf BHI-Platten ausplattiert, über Nacht aerob bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Dafür wurden die entstandenen *S. aureus*-Kolonien auf den BHI-Agarplatten ausgezählt und damit die KBE/ml Kultur berechnet.

### 2.2.1.4 Test der Substanzen auf antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* N315

Alle Substanzen, die eine Wirkung im Adhäsionstest zeigten, wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten auf antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* N315 getestet. Dazu wurde zunächst eine ü. N. Vorkultur in BHI-Medium so verdünnt, dass eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,015 vorlag. Eine MTP wurde bis auf Spalte 1 komplett mit je 60 µl BHI/Well befüllt. In Spalte 1 wurden 31,5 µl BHI/Well pipettiert und in die Wells B1 - F1 zusätzlich 3,5 µl der zu testenden Substanzen (1:10 Verdünnung, Stock: 10 mM) gegeben. In Well G1 wurden 3,5 µl DMSO gegeben, die Wells A1 und H1 blieben nur mit Medium befüllt (Randeffekt). Es erfolgte in den Reihen der MTP eine serielle Verdünnung mit 30 µl (Verdünnung 1:3) von links nach rechts. Abschließend wurden je 120 µl der Bakteriensuspension in jedes Well gegeben. Die optische Dichte wurde stündlich bei 600 nm gemessen. Die Absorptionswerte nach 5 h Wachstum wurden zur Bestimmung des MHK-Werts herangezogen.

## 2.2.2 Arbeiten mit Zellkulturen

### 2.2.2.1 Kultivierung

Für alle Zellkulturarbeiten wurden die benötigten Medien vor Arbeitsbeginn auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> unter Wasserdampfsättigung in Zellkulturflaschen kultiviert. Es wurde mit Zellkulturflaschen gearbeitet, die eine Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> hatten. Diese wurden mit 10 ml Medium befüllt. Die adhärennten Zellen wurden subkonfluent (~80-90% Konfluenz) geerntet und passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden des Gefäßes gekratzt und die Zellen

wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer sterilen Einmalplastikpipette durchmischt und vereinzelt. Anschließend wurde ein Aliquot in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

*Trypsinierung:* Zum Vereinzeln der Zellen vor dem Auszählen wurden die Zellen trypsinisiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 ml sterilem EBSS gewaschen, 1 ml einer 1 %igen Trypsin-Lösung wurde mehrmals über den gesamten Flaschenboden gegeben und bis auf einen dünnen Film wieder abgezogen. Es folgte eine Inkubationszeit bei 37 °C für ca. 5 min, bis sich die Zellen deutlich sichtbar vom Boden ablösten. Anschließend wurden diese in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt.

Die Zelllinie wurde maximal 1 Jahr in Kultur gehalten. Halbjährlich wurde sie mithilfe des MycoAlert® Detection Kits auf Mycoplasmen getestet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, jedoch adaptiert auf 384-Well-MTPs mit ¼ der angegebenen Volumina.

*Primärzellen:* Die in dieser Arbeit eingesetzten Primärzellen wurden ca. vier Wochen (max vier Passagen) in Kultur gehalten und dann verworfen. Nach Erreichen von ~80-90% Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vereinzelt und abgelöst (siehe oben), allerdings wurde das Medium unmittelbar nach Resuspension abzentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in frischem Medium aufgenommen und anschließend ausgezählt.

#### **2.2.2.2 Lagerung**

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation (3000 rpm, 3 min) pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Lagerung erfolgte im Kryoröhrchen bei -70 °C für mindestens 24 h und dann dauerhaft im flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

Zum Reaktivieren einer Kryokonserven der A-549-Zellen wurde die Zellsuspension schnell bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Nach spätestens einem Tag wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt, um das DMSO des Einfriermediums vollständig zu entfernen. Mit den Primärzellen wurde ähnlich verfahren. Jedoch wurden diese nach Aufnahme in frischem Medium sofort abzentrifugiert und erneut in frischem Medium aufgenommen, um das Einfriermedium direkt zu entfernen.

#### **2.2.2.3 Vitalitätstest**

Für die Vitalitätstests wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und mit 5000 Z/W (in 120 µl) in die Reihen B-G einer 96-Well-MTP gegeben; die Reihen A und H wurden nur mit Medium befüllt. In eine andere 96-Well-MTP wurden in jedes Well 100 µl Medium gegeben und in Spalte 1 zusätzlich 50 µl der Probe (zwei Proben in Doppelbestimmung und Lösemittelkontrolle). Es erfolgte eine serielle Verdünnung mit 50 µl (Verdünnung 1:3) von links nach rechts. Aus dieser Probenplatte wurden dann je 60 µl in die gleichen Wells der ersten Mikrotiterplatte (mit den Zellen) transferiert. Nach einer 24-stündigen bzw. 5-tägigen Inkubation wurde ein MTT-Test durchgeführt.

Der MTT-Test erfolgte mit leichten Veränderungen nach Mosmann [1983]. Es wurden 20  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (5 mg/ml) in jedes Well gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen und 100  $\mu\text{l}$  eines Isopropanol-HCl-Gemisches (100 ml 2-Propanol mit 400  $\mu\text{l}$  konz. HCl) gelöst und photometrisch bei 595 nm in einem Plattenphotometer vermessen.

Die Ergebnisse wurden mit Excel dargestellt und die Konzentration, bei der die Zellvitalität um 50 % reduziert war, als  $\text{IC}_{50}$ -Wert definiert (für den  $\text{IC}_{90}$ -Wert entsprechend bei 90 % inhibierter Vitalität).

## 2.2.3 Entwicklung und Etablierung des Hochdurchsatz-Adhäsionsassays

### 2.2.3.1 Screening: Zugabe der Substanzen

Nachdem das Medium von den A-549-Zellen abgenommen wurde, wurden 75  $\mu\text{l}$  Infektionsmedium zugegeben und die zu testenden Substanzen mit dem Pintool des Pipettierroboters zugefügt. Das Pintool transferiert je nach Lösungsmittel 70-80 nl pro Vorgang. Je nach Konzentration der Substanzen in der Screeningplatte wurde die Substanzverteilung mit dem Pintool so oft wiederholt, dass eine Endkonzentration von ca. 20  $\mu\text{M}$  in den Testplatten vorlag. Die Nadeln des Pintools wurden jedes mal mehrmals mit dem Lösemittel, in dem die Substanzen vorlagen, gewaschen und trocken getupft, bevor ein erneutes Eintauchen in die Screeningplatte erfolgte, um eine Verunreinigung der Substanzen zu vermeiden. In der letzten Spalte der Screeningplatte befand sich in vier Wells das Lösemittel als Negativkontrolle, was ebenfalls mit dem Pintool transferiert wurde. Die anderen vier Wells der Screeningplatte waren für das Hinzufügen assayspezifischer Kontrollen nicht befüllt. In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assay wurde in jede Testplatte manuell Polyinosinsäure (Poly(I)) als Positivkontrolle pipettiert, um eine platteninterne Kontrolle für die Funktionalität des Assays vorliegen zu haben.

### 2.2.3.2 Optimierung der Waschprozedur

Nach Zugabe von *S. aureus* zu den in 96-Well-Platten kultivierten Epithelzellen diente eine einstündige Inkubationsperiode der Ausbildung von Adhäsions-Wechselwirkungen. Die im Folgenden beschriebenen Waschmethoden wurden jeweils im Anschluss an diese Adhäsions-Inkubationsperiode durchgeführt, um die nicht-adhärenenten Bakterien zu entfernen. Es wurde jede Mikrotiterplatte drei Mal mit PBS gewaschen.

*Tauchbad:* Die 96-Well Mikrotiterplatten wurden vertikal in ein großes Becherglas eingetaucht, das mit PBS gefüllt war. Um einen Austausch der Flüssigkeit und somit ein „Herausschwemmen“ der nicht-adhärenenten Bakterien zu gewährleisten, wurde die MTP jeweils für 5 min in dem Tauchbad leicht geschwenkt, bevor sie vorsichtig wieder herausgenommen und in ein Becherglas mit frischem PBS getaucht wurde. Nach Durchführung des letzten Waschschriffs wurde die Platte auf Zellstoffpapier ausgeklopft.

*Pipettierroboter:* Unter Einsatz des Pipettierroboters wurde der Medienüberstand abgenommen und mit 50  $\mu\text{l}$ /Well PBS gewaschen. Die Eintauchtiefe zum Abnehmen der Waschflüssigkeit wurde so optimiert, dass die Spitzen des Pipettierkopfes den Zellrasen gerade



nicht berühren, jedoch die Flüssigkeit möglichst direkt oberhalb des Zellrasens abnehmen, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu entfernen. Die Geschwindigkeit zur Zugabe und Abnahme der Waschlösung wurde variiert, ebenso wurde getestet, nach Zugabe der Waschlösung diese drei Mal hoch und runter zu pipettieren, um den Zellrasen gut, aber schonend, zu spülen. Auch die Geschwindigkeit dieses Spülvorgangs wurde variiert.

*Vakuum-Absaugpumpe und Pipette:* Auf den Schlauch einer Vakuum-Absaugpumpe wurde ein 8-Kanal-Kamm gesetzt, mit dem die Flüssigkeit manuell Spalte für Spalte abgesaugt wurde. Zum Absaugen wurde die Platte dabei leicht schräg gehalten und darauf geachtet, mit den Spitzen auf dem Absaugkamm nur leicht in einer Ecke des Wells den Zellrasen zu berühren. Dabei wurde die Platte bei den einzelnen Absaugschritten stets in die gleiche Richtung gekippt und die Spitzen jeweils in die gleiche Ecke getaucht, in der sich die Flüssigkeit ansammelte. Die Zugabe von frischer Lösung erfolgte mit Hilfe einer 8-Kanal-Multidispense-Pipette.

*Abnehmen mit der Mehrkanal-Pipette:* Diese Vorgehensweise entspricht der zuletzt beschriebenen Methode, jedoch wurde hier manuell mit der Mehrkanal-Pipette vorsichtig abgesaugt.

*Ausschlagen der Platten:* Bei dieser Methode wurde die Platte, mit den Wells nach unten gerichtet, auf saugfähigem Papier ausgeklopft und frische Waschlösung mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette im Multidispense-Modus zugegeben.

### **2.2.3.3 Detektion und Färbung von *S. aureus***

Für die verschiedenen Färbungen bzw. Detektionsmethoden wurden jeweils einige ml einer *S. aureus* N315 ü. N. Kultur entnommen, das Medium abzentrifugiert und das bakterielle Pellet zwei Mal mit PBS gewaschen.

#### **2.2.3.3.1 Direkte Färbung der Bakterien vor Zugabe zu den Epithelzellen**

Bei den beiden nachfolgend aufgeführten Methoden wurden die Bakterien zunächst markiert und die bereits markierten Bakterien anschließend für den Adhäsionsversuch eingesetzt.

##### *Färbung der Bakterien mit FITC – Messung der Fluoreszenz*

Bei dieser Methode wurden die gewaschenen Bakterien (nach Einstellen einer OD<sub>600</sub> von 1,0) mit 200 µg/ml FITC in PBS für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde entfernt, indem die Suspension auf Membranfilter gegeben und zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde entfernt und die Bakterien, die sich auf der Membran befanden, wurden erneut mit PBS gewaschen.

##### *Markierung der Bakterien mit Syto 9 – Messung der Fluoreszenz*

Eine Markierung mit Syto 9 erfolgte, indem 1 ml einer bakteriellen Suspension (OD<sub>600</sub> von 1,0) mit geringen Mengen einer 1 mM Syto 9 Stammlösung versetzt wurde. Im Zuge der Optimierung dieser Färbemethoden wurden verschiedene Konzentrationen an Syto 9 und verschiedene Inkubationszeiten getestet. Für spätere Färbungen wurde eine Konzentration von 0,5 µM Syto 9 für 5 min zugesetzt.

Die Zellkerne der Epithelzellen wurden vor Zugabe der gefärbten Bakterien markiert, indem Höchst 33342 mit einer Endkonzentration von 5 ng/ml in PBS für 30 min zu den Zellen gegeben wurde. Gegebenenfalls wurde auch das Cytoplasma mit CellTracker™ Red CMPTX gefärbt. Dieser Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 0,5-25 µM in serum-freiem Medium zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.3.3.2 Detektion der Bakterien mit Antikörpern nach Adhäsion**

Im Zuge der im Folgenden beschriebenen Detektionsmethoden wurde der Adhäsionsversuch mit ungefärbten *S. aureus* durchgeführt. Nach beendeter Adhäsion mit anschließendem Waschen erfolgte eine Fixierung des gesamten Zellverbundes mittels 4 %igem Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei RT. Erst nach Adhäsion und Fixierung wurden die Bakterien mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen Methoden mit Antikörpern markiert.

Bei allen Ansätzen erfolgte zunächst eine Inkubation mit einem primären Antikörper gegen *S. aureus*-Lipoteichonsäure aus Kaninchen. Dieser wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um die optimale Verdünnung zu ermitteln. Letztendlich wurde er in einer 1:5000-Verdünnung für 45 min zugegeben (50 µl/Well). Anschließend erfolgte eine Markierung mit Hilfe eines sekundären gekoppelten Antikörpers, der ebenfalls für 45 min bei RT auf den Zellen belassen wurde.

##### *Detektion mit einem HRP-gekoppelten Antikörper – Messung der Absorption von chromogenen Substraten*

Es wurden verschiedene sekundäre Antikörper getestet, da unspezifische Bindungen auftraten. Letztendlich wurde ein HRP-konjugierter AK anti-Kaninchen (aus Ziege) von Dianova (Hamburg) ausgewählt und in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt.

Als chromogenes Substrat diente sowohl OPD (o-Phenylenediamin dihydrochlorid) von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) als auch TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) von Interchim Bioscience Innovations (Montluçon, Frankreich). OPD lag in Form von Tabletten mit jeweils 5 mg Inhalt vor. Eine Tablette wurde in 5 ml Wasser gelöst und direkt vor Gebrauch wurden 10 µl/ml einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung zugesetzt. Diese Lösung wurde zu den mit den Antikörpern markierten Zellen gegeben und die Platte für 10-15 min unter Lichtabschluss inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die TMB-Lösung wurde gebrauchsfertig bezogen und direkt auf die mit den Antikörpern markierten Zellen gegeben und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde bei einer Wellenlänge von 650 nm vermessen.

##### *Detektion mit einem HRP-gekoppelten Antikörper – Messung von Chemilumineszenz*

Zur Detektion der Bakterien mittels Chemilumineszenz wurde ebenfalls der HRP-konjugierte AK anti-Kaninchen (aus Ziege) von Dianova (Hamburg) eingesetzt und in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Als Substrat diente das BM Chemilumineszenz Elisa Substrat (POD - *peroxidase-based secondary detection systems*) von Roche. Hierbei handelte es sich um ein Set aus zwei Lösungen: 100 Teile Lösung A wurden mit 1 Teil Lösung B gemischt und 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Dann wurde diese Mischung auf die mit Antikörpern markierten Zellen gegeben und die Lumineszenz direkt im Mikrotiterplatten-Lese-

gerät quantifiziert. Die Messungen wurden im Abstand von wenigen Minuten wiederholt und die Signalintensitäten untereinander verglichen.

#### *Detektion mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper*

Beide Antikörper sowie die Dapi-Färbelösung wurden in 1 % BSA-PBS verdünnt. Nachdem zunächst der primäre Antikörper zugegeben wurde, erfolgte in den letzten 10 min dieser Inkubation die Färbung der Epithelzellkerne durch Zufügen von 50 µl/Well Dapi (Endkonz. 1 µg/ml). Der sekundäre AK Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen wurde nach einem Waschschrift in einer 1:1000-Verdünnung zugegeben. Nach erneutem 3maligen Waschen mit PBS wurden 100 µl PBS/Well auf den Zellen belassen, um die Quantifizierung vorzunehmen.

Die Quantifizierung erfolgte sowohl mit dem MTP-Lesegerät Fusion von Perkin Elmer (Messung der Fluoreszenz bei 485/530 nm) als auch durch Erstellung von Bildern mit dem IXM von Molecular Devices, welche anschließend mit Hilfe der Software MetaXpress analysiert wurden. Informationen über das IXM sowie die Einstellungen, die für die Erhebung der Daten für diesen Assay gewählt wurden, sind im folgenden Kapitel 2.2.3.4 aufgeführt.

### **2.2.3.4 Automatische Mikroskopie**

#### **2.2.3.4.1 Ausstattung**

Eingesetztes Modell: ImageXpress Micro (IXM) von Molecular Devices

High-Speed Laser Autofokus

Digitale CCD (*Charge-Coupled Device*) Kamera

300 Watt Xenon-Bogenlampe

Filter Sets: Dapi, FITC, TRITC, Texas Red

Nikon Objektive: 4X Plan Apo, NA (Numerische Apertur) 0,20  
10X S Fluor, NA 0,50  
20X S Fluor, NA 0,75  
40X Plan Apo, NA 0,95  
60X Plan Fluor, NA 0,85

Software: MetaXpress, AcuityXpress

#### **2.2.3.4.2 Akquise-Einstellungen**

Die Software MetaXpress dient zur Steuerung des IXM. Die wichtigsten Einstellungen, die für die Aufnahme der Bilder vorgenommen wurden, sind im Folgenden aufgeführt. Genauere Beschreibungen und detaillierte Angaben sind im Handbuch des Herstellers zu finden [Molecular Devices, Acquisition Guide, 2006].

*Vergrößerung:* Für das HTS wurde das 20X-Objektiv verwendet.

*Kamera-Binning* (Zusammenfassung): Binning beschreibt die Reduktion zweier oder mehrerer Pixel zu einem. Beispielsweise werden bei einem Binning mit dem Wert 2 2x2 Pixel zu einem Pixel zusammengefasst. Je größer der Wert des Binning, desto niedriger die

Auflösung, aber umso höher ist das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Binning reduziert außerdem die Belichtungszeiten, die Dauer der Aufnahme und die Größe der Datenmenge. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer mit einem Binning von 2 gearbeitet, da es einen guten Kompromiss zwischen anfallender Datenmenge und akzeptabler Auflösung darstellt.

*Kamera-Gain* (Verstärkung): Der hier eingestellte Wert stellt die Verstärkung der Kamera dar. Je höher der Wert, desto kürzer die Belichtungszeiten. Da sowohl die Objekte als auch der Hintergrund verstärkt werden, wird das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis durch Erhöhung des Werts nicht verbessert. Es wurde hier immer ein Gain von 1 eingestellt.

*Platte*: Für die Einstellungen der Platte werden alle Plattendimensionen wie Höhe, Länge, Breite, Anzahl und Durchmesser der Wells, usw. benötigt. Diese Angaben wurden vom Plattenhersteller übernommen. Für eine optimale Bilderstellung sind hier insbesondere die genaue Vermessung der optischen Dichte des Plattenbodens sowie der Höhenunterschied zwischen zwei benachbarten Wells essentiell. Diese können mittels des Lasers bestimmt werden. Die Werte müssen nur einmal für jedes Fabrikat erhoben werden und können anschließend übernommen werden.

*Auswahl der Wells*: Für die Akquise können die Positionen ausgewählt werden, in denen Bilder erstellt werden sollen. Beim Screenen waren meist alle Wells belegt und somit wurden Bilder aus allen Wells aufgenommen. Bei späteren Tests einzelner Hits wurden, soweit möglich und praktikabel, die Wells in den Reihen A und H nicht belegt und somit nicht aufgenommen (s. u.).

*Auswahl der Sites* (Bildpositionen): Die Anzahl sowie die Lage der aufzunehmenden Bilder in jedem Well konnten manuell bestimmt werden. Für das HTS wurden neun Positionen aufgenommen, die mittig lagen (siehe Abbildung 3-3), aus denen bei der Auswertung die Werte gemittelt wurden.

*Anzahl der Wellenlängen*: Für das HTS wurden immer zwei Wellenlängen bzw. Filter verwendet: Dapi (für die gefärbten Zellkerne der Epithelzellen) und FITC (zur Quantifizierung der Bakterien).

*Autofokus-Option*: Bei der Arbeit mit dem IXM kann zwischen laser- und bildbasiertem Autofokus gewählt werden. Beim bildbasierten Fokus werden in einem vorher bestimmten Bereich mehrere Bilder erstellt und das am besten fokussierte Bild, basierend auf speziellen Algorithmen, automatisch ausgewählt. Die Aufnahme der Bilder mit dieser Methode ist zeitintensiver als die Aufnahme mit laserbasiertem Autofokus, bei dem anhand von Laserreflektionen der Boden des Wells ermittelt wird. Da mittels der etablierten Methode viele Substanzen auf Aktivität getestet werden sollten, wurde stets der laserbasierte Fokus verwendet, da dies eine große Zeitersparnis im Gegensatz zum bildbasierten Autofokus darstellt und die Aufnahmen zufriedenstellende Ergebnisse lieferten.

*Autofokus-Einstellungen* (laserbasiert): Hier kann gewählt werden, an welchen Stellen Laserreflektionen zur Bestimmung der Aufnahmeposition verwendet werden sollen (Plattenboden, Wellboden oder beides). Dafür spielt z. B. die Dicke des Plattenbodens eine Rolle. Es wurde immer auf den Wellboden fokussiert. Des Weiteren kann bestimmt werden, ob für jedes Bild

fokussiert werden soll oder nur ein Mal pro Well. Die Einstellungen für diese Arbeit waren stets der Autofokus aller Bilder.

*Einstellungen für die Wellenlängen:* Für jede Wellenlänge mussten sowohl die Belichtungszeit als auch die Z-Position für die Aufnahme (Entfernung vom Wellboden) festgelegt werden. Diese wurden manuell eingestellt und optimiert und teilweise von Zeit zu Zeit nachjustiert.

#### **2.2.3.4.3 Bildanalyse: Software, Einstellungen und Hintergrund**

Im Folgenden werden nur die für diese Arbeit wichtigen Einstellungen und Parameter zur Bildanalyse beschrieben [Molecular Devices, Analysis Guide, 2006].

Verschiedene Applikationsmodule stehen für die Bildanalyse je nach Anwendungsziel zur Verfügung. Für diese Arbeit wurde ausschließlich das Modul „Transfluor“ verwendet. Transfluor wurde für die vorliegende Arbeit genutzt, um die Anzahl der Dapi-gefärbten A-549-Zellkerne zu bestimmen und die adhärenenten Bakterien zu quantifizieren. Zur Quantifizierung der Bakterien wurde bei diesem Modul die Option gewählt, die ursprünglich zur Erfassung intrazellulärer Vesikel dient. Die für die Anwendung dieses Moduls nötigen Einstellungen sind für beide Wellenlängen gleich: Es wurde die ungefähre Größe der Objekte (minimale und maximale Breite) sowie die Intensität der Färbung der Objekte, die von der Software erfasst werden sollen, festgelegt. Die Einstellungen wurden für beide Wellenlängen manuell optimiert und hin und wieder überprüft. Diese Kontrolle konnte anschaulich direkt am Beispiel eines Bildes erfolgen: Die fluoreszierenden Partikel, die aufgrund der getroffenen Einstellungen von der Software erfasst wurden, wurden direkt im Bild markiert. Gegebenenfalls wurden dann die Einstellungen modifiziert und erneut angepasst. Abbildung 3-4 zeigt beispielhaft diese direkte Markierung im Bild.

Die Software ist in der Lage, zahlreiche verschiedene Deskriptoren bei der Analyse mit dem Modul Transfluor anzugeben. Ausschlaggebend für diesen Anwendungsbereich war die Ausgabe des Deskriptors „*Vesicle area per cell*“ (Fläche der Vesikel pro Zelle). Dies entspricht hier der Fläche der adhärenenten Bakterien.

#### **2.2.3.5 Internalisierungsassay**

Eine ü. N.-Kultur von *S. aureus* N315 wurde zweimal mit PBS gewaschen und eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt. Diese wurde in einer 1:10 Verdünnung auf die Zellen gegeben und in den Platten 1 h bei RT inkubiert. Nach Abnahme der überschüssigen Bakterien und dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Platte in vier Segmente unterteilt, um auf vier unterschiedliche Methoden weiter zu behandeln: In einem Segment wurden die adhärenenten Bakterien wie im etablierten Adhäsionsassay mit 4 % PFA/PBS fixiert. Zum zweiten und dritten Segment wurde 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml Lysostaphin gelöst in RPMI-Infektionsmedium zugegeben (100 µl/Well). Zu den Zellen im vierten Segment wurde Infektionsmedium (100 µl/Well) ohne Zusatz von Lysostaphin gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im Zellkulturinkubator mit anschließendem zweimaligem Waschen der Wells mit PBS. Die Zellen der Segmente 2 bis 4 wurden dann ebenfalls mit 4 % PFA/PBS fixiert. Die Färbung aller

Zellen erfolgte anschließend wie im etablierten Protokoll des HTS-Assays (siehe 3.1.1.5) angegeben.

## 2.2.4 Synthese rekombinanter Proteine

### 2.2.4.1 Isolierung genomischer DNA von *S. aureus*

Die genomische DNA von *S. aureus* N315 wurde nach folgendem Protokoll isoliert (modifiziert nach (Marmur, 1961)):

10 ml einer ü. N. Kultur wurden bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Puffer P1 (Qiagen, Hilden) resuspendiert und mit 50 µl Lysostaphin (1 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 30-45 min wurden 100 µl SDS-Lösung (gesättigt in 45 % Ethanol) zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 650 µl 5 M NaCl wurde der Gesamtansatz mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) kräftig ausgeschüttelt und 10 min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde dann in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das Lysat klar war. Dieses wurde nun mit zweifachem Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die ausgefallene DNA konnte nun mithilfe einer gebogenen Pasteurpipette herausgenommen und in wenigen ml 70 %igem Ethanol gewaschen werden. Nach einer Trocknungszeit von ca. 20 min wurde die DNA abschließend in 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst und der DNA-Gehalt mit Hilfe des NanoDrops ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bestimmt.

### 2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

In einem PCR-Gefäß wurden folgende Komponenten vereint (angegeben sind die finalen Konzentrationen bzw. Mengen):

100 ng genomische DNA  
5 µl 10 X PCR-Puffer  
1 pmol Primer forward  
1 pmol Primer revers  
1 mM dNTPs (jedes 0,25 mM)  
2,5 U Taq-Polymerase  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
Endvolumen 50 µl (unter Zugabe von H<sub>2</sub>O)

Die Primerpaare für die vier verschiedenen Proteine sind in 2.1.10 aufgeführt und die Elongationszeit wurde der Länge der zu synthetisierenden DNA angepasst. Für jeden Ansatz wurden folgende Parameter angewandt:

Tabelle 2-14: PCR-Programm

Auszuführender Schritt	Zeit	Temperatur	Wiederholung des Zyklus
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 sek	94 °C	} 30 x
Anlagerung der Primer	30 sek	55 °C	
Elongation	1/3/4,5 min*	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

\*Als Elongationszeit wurde für die kodierende Sequenz des Proteins IsdA eine Zeit von 1 min gewählt, für die der Proteine ClfB und SdrC 3 min und für das größte Protein SdrD 4,5 min.

#### 2.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Wenige µl der Ansätze wurden nach Beendigung der PCR mit Ladepuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und 40 min bei 120 V aufgetrennt.

#### 2.2.4.4 Aufreinigung, Verdau und Ligation

Die durch PCR synthetisierte DNA wurde mittels des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Anschließend wurden die PCR-Produkte sowie der Vektor pET-33b(+) (Merck, Darmstadt) mit den Restriktionsenzymen XhoI und Eco521 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) für 4 h bei 37 °C verdaut. Nach erfolgreicher Klonierung in den Vektor pET-33b(+) steht die Expression der rekombinanten Proteine unter der Kontrolle des T7-Promoters (siehe 2.1.11). Die Klonierungsstrategie wurde so gewählt, dass die rekombinanten Proteine sowohl einen T7-tag als auch zwei His-tags (sowohl N- als auch C-terminal) tragen.

Nach Überprüfung des Verdaus auf Erfolg mittels elektrophoretischer Auftrennung wurden die Verdaue aufgereinigt (PCR-Purification Kit, Qiagen, Hilden) und die für die Oberflächenproteine kodierende DNA jeweils mit dem linearisierten Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase von Roche Diagnostics (Risch, Schweiz, siehe 2.1.12) für 16 h bei 16 °C. Es wurden pro Ligationsreaktion 60 ng Vektor-DNA und die 6fache Menge an Insert eingesetzt.

#### 2.2.4.5 Transformation

Die Ligationsansätze wurden mittels Hitzeschock in chemokompetente Zellen des Stammes *E. coli* DH5α eingebracht und auf LB-Medium mit Kanamycin selektiert. Dazu wurde die Ligations-DNA zunächst 15 min zusammen mit den *E. coli*-Zellen auf Eis inkubiert und die Mischung dann exakt 90 sek bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von LB-Medium wurde 20-30 min bei 37 °C inkubiert und der Transformationsansatz schließlich auf LB-Agar mit Antibiotika-Zusatz ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.4.6 Plasmid-Präparation und Kontrolle der Ligation und Transformation

Auf den Agar-Platten gewachsene Klone wurden gepickt und in LB-Medium mit Kanamycin vervielfältigt. Aus einer ü. N. Kultur erfolgte eine Plasmid-Präparation mit Hilfe des Plasmid-

Extraktionskits von Qiagen (Hilden). Mittels erneutem Verdau und elektrophoretischer Auftrennung der linearisierten DNA-Fragmente wurde der Erfolg der Ligation und Transformation überprüft.

#### 2.2.4.7 Protein-Expression

Zur Proteinexpression wurde pro rekombinantem Protein ein Klon ausgewählt, der das gewünschte Konstrukt trägt. Nach Isolierung der Plasmide wurden diese in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 eingebracht und die Transformation wurde erneut auf Erfolg überprüft. Pro Konstrukt wurde wieder ein Klon mit dem gewünschten Konstrukt ausgewählt und ü. N. in LB mit Kanamycin kultiviert. 500 ml LB mit Kanamycin wurden 1:100 mit dieser Vorkultur angeimpft und bei 26 °C über mehrere Stunden geschüttelt. Die OD<sub>600</sub> wurde regelmäßig überprüft. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. 3-4 h nach Induktion der Expression wurde die Kultur mittels Zentrifugation bei 4 °C geerntet. Die Zellpellets wurden bis zum Zellaufschluss und der Protein-Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.8 Zellaufschluss und Aufreinigung

Die bei -20 °C gelagerten Pellets wurden nach Auftauen in 30 ml 4 °C kaltem Lysepuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase sowie 5 mM MgSO<sub>4</sub> (Endkonz.) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators (Abteilung Molekulare Strukturbiochemie, HZI). Das Zellysat wurde 30 min bei 4 °C und 20.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgenommen. Auf eine Säulenmembran wurden 2 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und nach Durchlaufen der Flüssigkeit einige ml Waschpuffer I (siehe 2.1.7) zur Equilibrierung der Säule gegeben. Anschließend wurde der Überstand auf die Säule gegeben und diese mit steigenden Konzentrationen Imidazol (bis 50 mM – Waschpuffer I, II und III) gewaschen (ca. 6 ml jedes Waschpuffers). Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol.

Von den einzelnen Durchläufen bei der Waschprozedur sowie vom Lysat, vom Pellet und vom Eluat wurden Proben entnommen und auf einem 8 %iges SDS-Gel aufgetrennt.

#### 2.2.4.9 BCA-Test

Die Menge an aufgereinigtem Protein im Eluat wurde mittels des Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid* - BCA) -Tests der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) ermittelt. Dazu wurde eine Kalibriergerade mit BSA (Bovines Serumalbumin), welches in Elutionspuffer verdünnt wurde, erstellt und der Test laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Werte wurden gemittelt.

#### 2.2.4.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-Gelelektrophorese wurde sowohl mit den einzelnen Proben durchgeführt, die während der Proteinexpression genommen wurden als auch mit den aufgereinigten Proteinen. Dazu wurden einige µl (je nach OD der Kultur bzw. je nach Proteingehalt im Eluat) mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und die Proteine für 5 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie



bei 25 mA im Gel aufgetrennt wurden. Anschließend wurde entweder eine Coomassie-Färbung der Proteine im Gel durchgeführt (ü. N. mit Coomassie-Lösung färben, dann für 2 x 1 h Entfärben mittels Entfärbelösung, Aufbewahren in H<sub>2</sub>O) oder das Gel für einen Western Blot eingesetzt.

**Tabelle 2-15: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

	<b>Trenngel (10 %)</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
	Gesamtvolumen: 10 ml	Gesamtvolumen: 5 ml
H <sub>2</sub> O	4,05 ml	3 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
30 % Acrylamid	3,3 ml	650 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

#### **2.2.4.11 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot) und Detektion der transferierten Proteine**

Nach der SDS-PAGE wurden das zu blottende Gel sowie einige Filterpapier-Stücke und die Nitrocellulose-Membran kurz in Blot-Transferpuffer equilibriert. Auf die Kathode der Semidry Blotkammer (BioRad, München) wurden drei feuchte Filterpapiere aufgelegt und darauf luftblasenfrei die Nitrocellulose-Membran, das Acrylamidgel und drei weitere Filterpapiere geschichtet. Nach dem Aufbringen der Anode wurde eine Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche für 4 Stunden angelegt.

Nach Transfer der Proteine von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese 3 x mit TBS-T und nachfolgend 1 x mit TBS für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Membran ü. N. in 5 % (w/v) Magermilchpulver/TBS bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Membran wurde nun 1 h bei RT in einer Lösung des Primärantikörpers (1:500 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch/TBS) geschüttelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils fünf Minuten wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (1:2000 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch/TBS) für 1 h bei RT inkubiert.

Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese dann für fünf Minuten mit 3 ml Immune Star Substrat (BioRad, München), versetzt mit 150 µl Immune Star Enhancer (BioRad, München), inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde abschließend unter Lichtabschluss mit einem Röntgenfilm zusammengefügt und dieser nach variabler Zeit entwickelt.

### **2.2.5 Protein-Protein-Interaktionsstudien**

Die verwendeten Peptid-SPOT-Membranen wurden von der Arbeitsgruppe Chemische Biologie, HZI, synthetisiert. Als Trägermaterial für die Peptid-SPOTs dienten Cellulose-

membranen, auf der einzelne SPOTs in Form immobilisierter Peptide vorlagen. Die Peptidsynthese erfolgte direkt auf der Membran (siehe 1.3). Die in dieser Arbeit eingesetzten Cellulosemembranen besaßen auf ihrer Oberfläche insgesamt 790 verschiedene Peptid-SPOTs, welche auf zwei Blättern à 25 Spalten x 16 Reihen bzw. 25 Spalten x 9 Reihen angeordnet waren. Nach Fertigstellung der Membranen wurden diese bis zum Durchführen der Tests bei -20 °C gelagert.

*Durchführung der Bindungsstudien:* Der Bindungstest wurde nach folgendem Protokoll, basierend auf Frank, (Frank, 1992) durchgeführt: Alle Waschschritte wurden mit 10 ml Lösung 5 min unter ständigem Schwenken bei RT durchgeführt.

Zunächst wurde die noch trockene Membran mit einigen Tropfen 100 % Ethanol benetzt. Es folgten drei Waschschritte mit TBS, danach wurde die Peptid-SPOT-Membran ü. N. in 10 ml Blockingpuffer (siehe 2.1.4.) bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde einmal mit TBS-T gewaschen und ü. N. mit einem der rekombinanten Proteine (1:100 verdünnt in Blockingpuffer) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit TBS-T wurde mit einer Lösung des Primärantikörpers (1:100 verdünnt in 10 ml Blockingpuffer) für 1 h bei RT inkubiert und dann wieder dreimal mit T-TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (1:500 verdünnt in Blockingpuffer) wurde wieder für 1 h bei RT auf die Membran gegeben und anschließend wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen.

Abschließend wurde die Membran für drei Minuten mit 3 ml Immune Star Substrat (BioRad, München), versetzt mit 150 µl Immune Star Enhancer (BioRad, München), inkubiert, auf eine Glasplatte gelegt und mit einer Plastikfolie umschlossen. Unter Lichtabschluss wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser nach variabler Zeit entwickelt.

*Vortests:* Bevor mit Hilfe der Peptid-SPOT-Membranen der Interaktionstest mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt werden konnte, wurden die unspezifischen Wechselwirkungen sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper getestet. Alle Schritte dieser Vortests wurden wie nach oben beschriebener Vorgehensweise durchgeführt, aber ohne Zugabe rekombinanter Proteine.

*Strippen:* Nach Abschluss der Aufnahme der Signale wurde die Peptid-SPOT-Membran gestrippt, um Primär- und Sekundärantikörper von der Membran zu entfernen. Bis zum Strippen wurden die Membranen bei 4 °C in PBS gelagert. Das Strippen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zunächst wurde das Substrat durch kurzes zweimaliges Spülen mit PBS entfernt, gefolgt von drei jeweils 5minütigen Inkubationen in H<sub>2</sub>O (MilliQ). Es folgte die Zugabe von Puffer A, in welchem die Membran zunächst 5 min geschwenkt und anschließend für 7 min ins Ultraschallbad bei 40 °C überführt wurde. Dieser Schritt wurde zweimal jeweils mit frischem Puffer A wiederholt, bevor dann dreimal je 5 min in Puffer B geschwenkt wurde. Abschließend wurde dreimal für 5 min in 100 % Ethanol gewaschen und die Membran entweder getrocknet und wieder bei -20 °C gelagert oder für erneute Bindungsstudien wieder dreimal mit TBS gewaschen und ü. N. geblockt (weiter wie oben beschrieben).

### 2.2.5.1 Adhäsion der rekombinanten Proteine an HNEPC

Zur Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten Proteine (siehe 3.2.3) wurden HNEPC auf Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) kultiviert, die sich in Mikrotiterplatten mit vier Wells befanden. Dazu wurden 750 µl einer HNEPC-Zellsuspension mit einer Zelldichte von 27.000 Zellen/ml eingesät und vier Tage bei 37 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach vier Tagen wurden die rekombinanten Proteine in Zellkulturmedium (*Airway epithelial cell growth medium*, Provitro GmbH, Berlin) zugegeben (750 µl/Well, Proteinendkonzentration 10 µg/ml). Als Kontrolle wurde der Elutionspuffer, in dem die Proteine vorlagen, im Zellkulturmedium zugegeben. Die Ansätze wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 500 µl/Well 4 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die Färbungen wurden die beiden eingesetzten Antikörper 1:100 in PBS mit 10 % FCS verdünnt. DAPI wurde zu 10 µg/ml in PBS verdünnt. Die Zellen wurden 60 min mit 250 µl des primären Antikörpers (Anti-His-AK aus Maus, Merck, Darmstadt) bei RT behandelt und danach mit PBS gewaschen. Mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488® AK anti-Maus, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde ebenso verfahren. Nach einem erneuten Waschschrift wurde 10 min mit DAPI behandelt, bevor die Deckgläschen umgedreht (mit den Zellen nach unten) in einen Tropfen Einbettungsmittel (ProLong® Gold antifade reagent, Invitrogen, Carlsbad, USA) auf einen Objektträger gelegt wurden.

Die Betrachtung der gefärbten Zellen und die Aufnahme der Bilder wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioVert von Zeiss mit den Objektiven 20X, 40X, 63X und 100X unter Anwendung der Software AxioVision durchgeführt.

### 2.2.5.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die rekombinanten Proteine wurden mittels einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse, engl.: *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization- time of flight*). Dazu wurden diese zunächst mit dem Enzym Trypsin verdaut, welches Peptidbindungen spezifisch nach ganz bestimmten Aminosäuren spaltet, sodass für jedes Protein eine charakteristische Zusammensetzung an Polypeptidfragmenten entsteht. Die molekularen Massen der Spaltprodukte wurden danach mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Durch Abgleich der erhaltenen Fragmentmuster mit den für zahlreiche Proteine hinterlegten Spektren in Datenbanken (hier wurde NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - verwendet) kann für jede Probe mit hoher Wahrscheinlichkeit *in silico* bestimmt werden, um welches Protein es sich handelt.

Die Probenaufbereitung und alle weiteren Arbeitsschritte wurden von der Serviceeinheit Biophysikalische Analytik des HZI durchgeführt.

### 2.2.6 Transkriptomanalysen mittels *S. aureus* Genom-Microarrays

Für die Transkriptomanalysen in dieser Arbeit wurde der GeneChip® *S. aureus* Genome Array von Affymetrix verwendet. Dieser Microarray wurde in Kollaboration mit Pfizer entwickelt und ist geeignet, um die Genom-weite Genexpression von den vier folgenden *S. aureus* Stämmen zu studieren: N315, Mu50, NCTC 8325 und COL.

Der GeneChip® enthält Sonden gegen mehr als 3300 *S. aureus* ORFs (*Open Reading Frames*) und auch Sequenzen, um die Orientierung (sowohl strangaufwärts als auch strangabwärts) von über 4800 intergenischen Regionen innerhalb des *S. aureus* Genoms zu untersuchen. Weiterhin auf dem GeneChip® enthalten sind folgende Kontrollsequenzen:

- Hybridisierungskontrollen: *bioB*, *bioC*, *bioD*, and *cre* vom P1 Bakteriophagen
- Poly-A-Kontrollen: *dap*, *lys*, *phe*, *thr*, *trp* von *Bacillus subtilis*
- *r2*: *bioB*, *bioC*, *bioD*, *cre*, *dap*, *phe* und *thr*

Für die Transkriptomanalyse liegen auf dem GeneChip® 25-mer Oligonukleotid-Sonden immobilisiert vor, jede auf einer Fläche von 18 µM. Hierbei wird neben dem Oligonukleotid, das dem zu analysierenden Sequenzabschnitt komplementär ist (*perfect match oligo*, *PM*), ein Oligonukleotid mit einer eingefügten Fehlpaarung (*mismatch oligo*, *MM*) synthetisiert. Beide zusammen bilden ein Sondenpaar (*Probe Pair*). Alle Sondenpaare, die zusammen einen Sequenzabschnitt auf dem GeneChip® repräsentieren, werden als SONDENSET (*Probe Set*) bezeichnet. Die Verteilung der Sondenpaare eines SONDENSETS auf dem 1.28 cm x 1.28 cm großen GeneChip® erfolgt statistisch, um die Auswirkungen von uneinheitlichem Hybridisieren und Färben oder mechanischen Schädigungen, wie z. B. Kratzer, auf die Datenerhebung zu minimieren.

Um eine Analyse mit GeneChips® durchzuführen, wird zunächst die mRNA der Zellen, deren Expressionszustände miteinander verglichen werden sollen, isoliert und revers in cDNA transkribiert. Es folgt eine Markierung der cDNA, die anschließend auf die Arrays gegeben werden kann. Dort findet eine Hybridisierung mit den sich auf dem GeneChip® befindenden Sonden statt.

Zur Minimierung kulturbedingter Einflüsse wurde jeweils RNA aus drei unabhängigen Kulturen pro GeneChip®-Hybridisierung eingesetzt. Um Auswirkungen von Variationen der GeneChips® untereinander – fabrikationsbedingt oder basierend auf postsynthetischen mechanischen Schädigungen – zu reduzieren, wurden jeweils zwei GeneChips® pro Bedingung aufgewendet und ausgewertet. Zudem konnten so Auswirkungen von möglichen uneinheitlichen Hybridisierungsvorgängen oder von Schwankungen bei der cDNA-Generierung reduziert werden.

#### 2.2.6.1 Präparation der RNA für die Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalysen wurde der MRSA-Stamm N315 gewählt.

Um das Genexpressionsmuster unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu ermitteln, wurde sowohl nach Anzucht in verschiedenen Medien als auch zu verschiedenen Wachs-

tumsphasen RNA isoliert. Zunächst wurden dazu für die gewählten Medien Wachstumskurven erstellt, um die Zeitpunkte für die Wachstumsphasen zu ermitteln. Für die Transkriptomanalysen wurden nun die entsprechenden Mengen Medium mit einer gut gewachsenen ü. N. Kultur mit Start-OD<sub>600</sub> = 0,05 angeimpft und zu dem gewünschten Zeitpunkt geerntet. Dazu wurden einige ml der Kultur mit dem gleichen Volumen RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden) versetzt und nach kurzem Schütteln 5 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Pelletieren der Zellmasse für 15 min bei 4.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C nicht länger als wenige Tage bis zur Aufreinigung gelagert.

Zur Aufreinigung der RNA wurde das Pellet in 400 µl Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und mit 24 µg Lysostaphin für 30 min bei 40 °C kräftig geschüttelt. Anschließend wurden 700 µl RLT-Puffer (aus RNeasy Kit, Qiagen, Hilden), versetzt mit 1 % β-Mercaptoethanol, zugefügt. Das Gemisch wurde stark gevortext. Nach Hinzufügen von 25-50 mg säurebehandelten Glaskügelchen (150-210 µm) zu der Suspension wurde diese noch einmal 3 min stark gevortext und anschließend 3 min bei max. Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Ethanol versetzt und diese Mischung vorsichtig invertiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Aufreinigungssäulchen und der Puffer und Lösungen des RNeasy-Kits von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Nach der Aufreinigung wurde für 30 min bei RT ein DNase I-Verdau durchgeführt und die RNA anschließend erneut über ein frisches Säulchen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O.

Der RNA-Gehalt wurde mit Hilfe des NanoDrops ND-1000 bestimmt und die RNA bei -80 °C gelagert, bevor sie für die Hybridisierung entsprechend aufbereitet wurde.

#### **2.2.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption im UV-Bereich bei 260 und 280 nm, mit deionisiertem Wasser als Referenz. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl gleichgesetzt. Die Reinheit der RNA sollte nach einer 260/280-Messung bei mindestens 1,8 liegen, ein Quotient von 2,0 entspricht reiner RNA.

#### **2.2.6.3 Qualitätskontrolle der RNA**

Von den Mitarbeitern der Array Facility des HZI wurde die aufgereinigte RNA mittels des Agilent-2100-Bioanalyzers elektrophoretisch aufgetrennt. Bei qualitativ geeigneter RNA werden auf dem Gel drei distinkte Banden sichtbar, die der ribosomalen RNA (der 23S, 16S und 5S rRNA) entsprechen. Degradierete RNA würde in Form von indistinkten Banden erkennbar sein, die als „Schmier“ über den gesamten Auftrennungsbereich auftreten würden. Basierend auf dieser Auftrennung wurden mit Hilfe der dem Bioanalyzer beigefügten Software Elektropherogramme erstellt und jeweils eine „RNA Integrity Number“ (RIN) errechnet, anhand derer die Qualität der RNA beurteilt wurde.

#### 2.2.6.4 Microarray Hybridisierung

Die aus *S. aureus* isolierte RNA wurde an die Mitarbeiter der Array Facility des HZI gegeben. Die weitere Probenaufbereitung, die Hybridisierung der GeneChips® mit der gelabelten cDNA sowie das Auslesen der Microarrays mittels des Affymetrix GeneArray Scanners wurden von den Mitarbeitern dieser Serviceeinheit durchgeführt.

#### 2.2.6.5 Qualitätskontrolle und statistische Auswertung der Transkriptomdaten

Die Auswertung der Daten wurde von Dr. Raimo Franke, Abteilung Chemische Biologie, HZI, durchgeführt.

Die Rohdaten (*cel-files*) wurden in R (R Version 2.12.1) importiert und mit den Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) Paketen *affy* (Gautier *et al.*, 2004), *genefilter* (Gentleman *et al.*, 2011), *affyPLM* (Bolstad *et al.*, 2005) und *limma* (Smyth, 2005) bearbeitet.

Die Qualitätskontrolle der Microarrays erfolgte durch visuelle Inspektion diverser diagnostischer Plots und Image-Plots der Arrays. So wurden Boxplots von Transkript-Intensitäten, RLE- (*Relative Log Expression*) sowie NUSE- (*Normalized Unscaled Standard Error*) Plots erstellt (Bolstad *et al.*, 2005).

Von den 20 analysierten Arrays erfüllte einer die Qualitätsstandards nicht und wurde deshalb aus den folgenden Analysen ausgenommen. Die Pre-Prozessierung der Arrays (*background adjustment - normalization - summarization*) und die Berechnung der Expressionswerte erfolgte mit RMA (*Robust Multiarray Averaging*) (Irizarry *et al.*, 2003).

Vor der Ermittlung von differentiell regulierten Genen wurden die Dimensionen des erhaltenen Datensatzes reduziert. Dazu erfolgten zwei Filter-Schritte:

1. Intensität und Varianz: den Filter passieren nur *Probe Sets*, die in mindestens 25 % der Arrays einen Expressionswert größer als  $\log_2(100)$  aufweisen und deren IQR (*Interquartile Range*, Interquartilsabstand) der  $\log_2$ -Intensitäten größer als 0,5 ist.
2. Annotation: den zweiten Filter passieren nur *Probe Sets*, die im TrEMBL Proteom für *S. aureus* N315 (Stand Mai 2011: 2580 Proteine) enthalten sind. Damit werden alle Kontroll-*Probe Sets* und nur für andere Stämme relevante *Probe Sets* vor den statistischen Tests gefiltert.

Zur Ermittlung der differentiell exprimierten Gene kamen *limma* und *eBayes* zum Einsatz (Smyth, 2004). *Limma* nutzt für die Analyse ein lineares Modell. Die Empirical Bayes Korrektur mittels *eBayes* wurde genutzt, um auch bei wenigen Replikaten stabile Resultate zu produzieren. Bei den paarweisen Vergleichen der Expression wurde zur Ermittlung der differentiell exprimierten Gene eine zur Korrektur für multiples Testen geeignete Methode angewandt (FDR, *false discovery rate* (Benjamini and Hochberg, 1995)). Für die Ermittlung der differentiell exprimierten Gene bei einem Vergleich von zwei Bedingungen wurde ein Schwellenwert von  $p < 0,05$  nach FDR-Korrektur festgelegt.

Anreicherungsanalysen (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*) wurden mit dem Software-Paket DAVID (Version 6.7) durchgeführt, wobei das *S. aureus* Gesamt-Proteom als Hintergrund für die Anreicherungsanalyse verwendet wurde und ein modifizierter „Exakter

Test nach Fisher“ zur Errechnung der p-Werte genutzt wurde (Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009). Dazu wurden zunächst die Affymetrix *Probe* IDs (ID = *Identifier*) in Uniprot *Entry* IDs umgewandelt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).





## 3 Ergebnisse

### 3.1 Adhäsionsassay

#### 3.1.1 Entwicklung und Etablierung

Das erste Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines stabilen und aussagekräftigen Adhäsionsassays, der für die Testung zahlreicher Substanzen geeignet ist. Dazu wurden verschiedene Durchführungsschritte evaluiert und variiert, um jeweils das Optimum zu finden. Im Folgenden werden einige Ergebnisse dieses Optimierungsprozesses beschrieben, die zur Erstellung des finalen Durchführungsprotokolls führten.

##### 3.1.1.1 Auswahl der Zelllinie und des bakteriellen Stammes

Zunächst wurde eine Epithelzelllinie für die Durchführung des Assays ausgewählt. Studien zur Adhäsion von *S. aureus* an humane Zellen wurden oftmals mit der Lungenepithelzelllinie A-549 durchgeführt (Arita *et al.*, 2004; Weidenmaier *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006). Diese Zellen stammen, so wie nasale Epithelzellen, aus den Atemwegen. Die A-549-Zellen wurden zur Durchführung der Screening-Experimente gewählt und die Wirksamkeit identifizierter Substanzkandidaten wurde mit humanen nasalen Epithel-Primärzellen (HNEPC) überprüft.

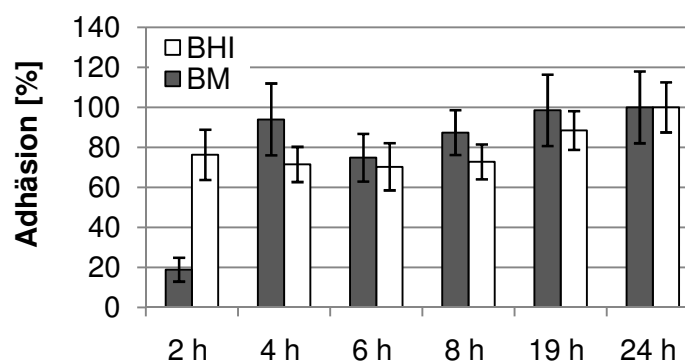
Eine weitere Entscheidung wurde bezüglich des einzusetzenden *S. aureus*-Stammes getroffen. Da im Rahmen dieser Arbeit Transkriptom-Daten erhoben werden sollten, war ein Auswahlkriterium, dass für den im Screening eingesetzten Stamm ein kommerziell erhältlicher Microarray Chip existieren sollte. Zu Beginn dieser Arbeiten stand ein kommerzieller Microarray Chip für *S. aureus* von der Firma Affymetrix zu Verfügung, der Nukleotidsequenzen der vier *S. aureus* Stämme N315, Mu50, NTCT 8325 und COL enthielt. Außerdem sollte der eingesetzte Stamm nach Möglichkeit ein natürliches Isolat darstellen. Aufgrund der steigenden MRSA-Raten in zahlreichen Ländern (siehe Abbildung 1-3) und der klinischen Relevanz dieser MRSA-Stämme war das Vorliegen einer Methicillin-Resistenz (MRSA) ein weiteres Kriterium. Alle Auswahlkriterien wurden vom MRSA-Stamm N315 erfüllt. Dieser Stamm zeigte zudem in Vorversuchen ein gut ausgeprägtes Adhäsionslevel an A-549-Zellen und wurde somit für die Screening-Experimente eingesetzt.

##### 3.1.1.2 Optimierung der Adhäsionsbedingungen

Die A-549-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/Well (100.000 Zellen/ml) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 4-5 Tage bei 37 °C inkubiert, bis eine vollständige Konfluenz erreicht wurde. Es wurden verschiedene Aussaatdichten und Inkubationszeiten getestet (ohne Abbildung). Die oben genannte Aussaatdichte mit nachfolgender Inkubation für 4-5 Tage stellte die optimale Vorgehensweise dar, um ein gleichmäßiges

Wachstum zu erzielen. Nach dieser Zeit lagen zudem nur wenige Zellen in zweiter Schicht auf. Da die Bakterien auch stark an Plastik und somit an den Boden der Wells adhären können (van Wamel *et al.*, 1998; Aydinuraz *et al.*, 2009), war es essentiell, dass die A-549-Zellen bei Zugabe der Bakterien den Boden der Mikrotiterplatte möglichst komplett bedeckten.

Die Adhäsionsstärke der Bakterien ist laut Literaturangaben von der Wachstumsphase abhängig (van Wamel *et al.*, 1998; Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000). Deshalb wurden Vorversuche durchgeführt, in denen *S. aureus* N315 nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten im Adhäsionsexperiment eingesetzt wurde. Die Bakterien wurden zudem vergleichsweise in zwei verschiedenen Vollmedien kultiviert, BHI und BM. Abbildung 3-1 zeigt das Ergebnis dieser zeitabhängigen Experimente unter Einsatz der beiden Vollmedien.



**Abbildung 3-1: Adhäsion von *S. aureus* in Abhängigkeit der Wachstumsphase**

Adhäsion von *S. aureus* N315 an die Epithelzelllinie A-549 nach Kultivierung in BHI (weiß) und BM (schwarz). Die Bakterien wurden jeweils nach verschiedenen Kultivierungszeiten im Adhäsionsexperiment eingesetzt. Die Adhäsionsstärken wurden mit dem IXM ermittelt (siehe unten). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 16 Wells pro Zeitpunkt und Vollmedium.

Die Darstellung in Abbildung 3-1 wurde so gewählt, dass die höchsten Adhäsionsstärken mit einer 100 %igen Adhäsion gleichgesetzt und die anderen Adhäsionswerte darauf bezogen wurden. Mit Zunahme der Vorkultivierungszeiten ist in beiden Medien ein Anstieg der Adhäsionsstärke festzustellen. Nach Kultivierung im Vollmedium BM zeigten die Bakterien nach 2 h Wachstum eine um 80 % reduzierte Adhäsionsstärke im Vergleich zur ü. N.-Kultivierung. Im weiteren Verlauf zwischen 4 h und 24 h ist die Zunahme geringer. Zur Durchführung von Adhäsionsstudien mit *S. aureus* an humane Zellen wurde in anderen Untersuchungen meist BHI zur Kultivierung der Bakterien verwendet (van Wamel *et al.*, 1998; Hoefnagels-Schuermans *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002; Blickwede *et al.*, 2005). Deshalb wurde dieses Medium auch für diese Arbeit eingesetzt. Aufgrund der zeitlichen Praktikabilität und des oben dargestellten Ergebnisses kamen ü. N.-Kulturen zur Anwendung.

Die Menge der in den Adhäsionsversuchen eingesetzten Bakterien wurde an die Sensitivität der jeweiligen Quantifizierungsmethode angepasst. Bei der final gewählten Quantifizierungsmethode unter Anwendung des automatischen Mikroskops ImageXpress Micro (IXM) erwies sich die Verwendung einer Bakteriensuspension mit OD<sub>600</sub> von 0,25 als besonders günstig.

Ein wichtiger Aspekt war zudem die Festlegung der Adhäsionszeit sowie der Inkubationstemperatur. Es wurde eine Adhäsionszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur gewählt (Erläuterungen unter 4.1.1).

### 3.1.1.3 Optimierung der Waschprozedur

Im Anschluss an die Adhäsionsperiode wurde der Zellrasen gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Hierbei musste eine Waschmethode gefunden werden, die alle nicht-adhärenenten Bakterien effektiv vom Zellrasen entfernt, ohne dabei die adhärenenten Bakterien durch mechanische Einwirkungen zu lösen. Ein essentielles Kriterium war zudem, dass der Zellrasen dabei intakt blieb.

Verschiedene Möglichkeiten wurden getestet (siehe 2.2.3.2). Neben der Überprüfung des intakten Zellrasens und der Funktionalität des Assays wurde evaluiert, wie stabil und zuverlässig die Methode ist. Dazu wurden alle Wells einer 96-Well-Platte gleich behandelt und die Gleichmäßigkeit über die gesamte Platte ermittelt. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieses Optimierungsschrittes aufgeführt.

*Tauchbad:* Der Einsatz eines Tauchbades resultierte in einem hohen Verlust der A-549-Zellen. Zusätzlich befanden sich nach der Waschprozedur auch Bakterien an den Stellen des Plattenbodens, an denen sich die Epithelzellen abgelöst hatten. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Bakterien bei Inkubation im Tauchbad zu den Stellen am Plattenboden diffundierten, an denen sich die Zellen ablösten und dort adhärten.

*Ausschlagen der Platten:* Diese Methode zur Entfernung von Flüssigkeiten wird oftmals in der Laborpraxis angewandt, da sie schnell und effizient ist. Jedoch ging die Anwendung in diesem Falle ebenfalls mit deutlichen Epithelzellverlusten einher.

*Abnehmen mit der Mehrkanalpipette:* Hierbei konnte kein Zellverlust beobachtet werden. Diese Methode ist eine der schonendsten unter den hier vorgestellten, im Vergleich zur Vakuum-Absaugpumpe jedoch zeitaufwendiger.

*Einsatz des Pipettierroboters:* Erfolgte der Waschvorgang mit Hilfe des Pipettierroboters, blieb der Zellrasen intakt. Die Gleichmäßigkeit über die gesamte Platte war im direkten Vergleich zu der Waschmethode „Vakuum-Absaugpumpe und Pipette“ jedoch herabgesetzt. Außerdem wurde bei Einsatz einer adhäsionsreduzierten *S. aureus*-Mutante als Kontrolle (siehe 3.1.1.6.1) nicht das erwartete Ergebnis erreicht. Die Funktionalität des Assays war demnach mit dieser Methode nicht gegeben.

*Vakuum-Absaugpumpe und Pipette:* Mit dieser Waschprozedur trat nur in einigen Wells ein minimaler Zellverlust auf. Dieser Zellverlust war lokal auf den Eintauchpunkt des Absaugkammes begrenzt und konnte bei der finalen Quantifizierungsmethode berücksichtigt werden. Zudem ergab die Überprüfung der Gleichmäßigkeit akzeptable Werte, sodass diese Waschmethode für die Durchführung des Screenings gewählt wurde.

### 3.1.1.4 Ermittlung der optimalen Quantifizierungsstrategie

Ein Schwerpunkt bei der Entwicklung des Assays war das Auffinden und Etablieren einer geeigneten Methode zur Quantifizierung der adhärenenten Bakterien. Die Methode sollte eine

gute Sensitivität aufweisen, um Unterschiede im Adhäsionsverhalten der Bakterien hinreichend zu erkennen. Es wurden verschiedene Möglichkeiten getestet (siehe 2.2.3.3), die Ergebnisse sind nachfolgend vorgestellt.

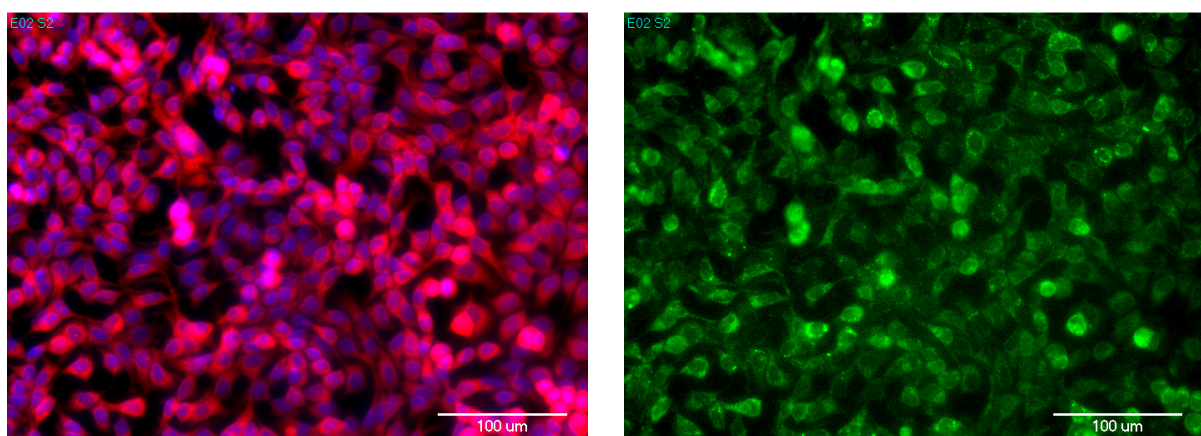
#### 3.1.1.4.1 Färbung der Bakterien mit FITC – Messung der Fluoreszenz

Der Markierungsmechanismus von Bakterien mittels FITC beruht darauf, dass FITC mit den Aminogruppen der Proteine an der Oberfläche der Bakterien eine chemische Bindung eingeht. Die Färbung von Bakterien mit FITC ist ein bekanntes Verfahren (Agerer *et al.*, 2004; Weidenmaier *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Markierung mit den nachfolgend vorgestellten Methoden ist FITC sehr kostengünstig und folglich für einen Hochdurchsatz-assay attraktiv. Die Färbung erwies sich jedoch in folgenden Punkten als nachteilhaft:

Unter Anregung mit der Extinktionswellenlänge wird das Fluorophor schnell gebleichen (Longin *et al.*, 1993; Benchaib *et al.*, 1996). Das schnelle Ausbleichen war bei Anwendung des IXM störend für die Optimierung der Fokussierung und der Belichtungszeit. Zudem ist im Zusammenhang mit der Suche neuer adhäsionsinhibitorischer Substanzen nicht ausgeschlossen, dass die FITC-Markierung selbst Adhäsions-Interaktionen beeinflusst (Barthelson *et al.*, 1999) (siehe auch 4.1.1.4).

#### 3.1.1.4.2 Markierung der Bakterien mit Syto 9 – Messung der Fluoreszenz

Der membranpermeable Fluoreszenzfarbstoff Syto 9 wird zur Markierung sowohl lebender als auch toter Bakterien eingesetzt. Der Markierungsmechanismus beruht auf einer Interaktion des Syto 9 mit Nukleinsäuren. Ein Vorteil der Markierung mit Syto 9 (ebenfalls grün fluoreszierend) im Gegensatz zur Färbung mit FITC war die geringere Inkubationszeit der Bakterien mit den Färbereagenzien (5 min vs. 1 h). Der Zeitaufwand ist ein wichtiger Faktor bei einem Hochdurchsatz-Verfahren. Darüber hinaus trat bei Anwendung des IXM kein störendes Bleichen auf.



**Abbildung 3-2: Färbung der Bakterien mit Syto 9**

Die Inkubation der gefärbten Bakterien mit den Epithelzellen führte auch zur Färbung der Epithelzellen mit Syto 9. links: vereinte Darstellung der Aufnahmen mit Texas Red- und Dapi-Filter; rechts: Aufnahme mit FITC-Filter.

Die Markierung der Bakterien mit Syto 9 erfolgte, so wie die Markierung mit FITC, vor Zugabe zu den Epithelzellen. Nach Adhäsion und Gegenfärbung der Epithelzellkerne und

des Cytoplasmas mit Dapi bzw. CellTracker™ zeigte sich, dass auch die Epithelzellen mit Syto 9 gefärbt wurden (siehe Abbildung 3-2).

Auch ein gründliches Waschen der Bakterien nach der Behandlung mit Syto 9 sowie eine maximal mögliche Reduktion der Farbstoffmenge brachte keine Verbesserung. Vermutlich diffundierte Syto 9 während der Adhäsionsperiode aus den Bakterien heraus und wurde von den A-549-Zellen aufgenommen. Somit erwies sich die Markierung mit Syto 9 als ungeeignet.

#### **3.1.1.4.3 Detektion der Bakterien mit einem HRP-gekoppelten Antikörper**

Da die direkte Färbung sowohl mit FITC als auch mit Syto 9 nicht erfolgreich eingesetzt werden konnte, wurde *S. aureus* unter Verwendung von Antikörpern detektiert. Die Antikörperdetektion erfolgte nach Adhäsion sowie nach Fixierung der Zellverbände mit Paraformaldehydlösung. Nach Inkubation mit einem gegen die Lipoteichonsäure von *S. aureus* gerichteten Antikörper (primärer Antikörper) wurde mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten, HRP (*Horse-Radish-Peroxidase*)-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Detektion der HRP wurde sowohl mit chromogenen Substraten als auch mit einem Chemilumineszenz-Substrat getestet. Zur Quantifizierung der umgesetzten Farbstoffmenge bzw. der Signale wurde ein Mikrotiterplatten-Lesegerät verwendet.

Die Quantifizierung adhärenter Bakterien mit chromogenen Substraten (OPD - o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid und TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) erwies sich als nicht ausreichend sensitiv. Die Anwendung eines Chemilumineszenzsubstrats führte hingegen zu guten Ergebnissen. Nachteilig bei dieser Methode war nur das kurze Zeitfenster von wenigen Minuten, das nach Zugabe des Substrats für die Vermessung der Platten zur Verfügung stand, bevor die Signalintensitäten unzureichend schwach wurden.

Parallel wurde die Quantifizierung unter Anwendung des IXM und der Software MetaXpress evaluiert. Aus den besonders unter 4.1.2 herausgestellten Gründen erwies sich diese Methode als besonders vorteilhaft und wurde für die Untersuchungen angewandt. Sie wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

#### **3.1.1.4.4 Detektion der Bakterien mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper und dem IXM**

Die Detektion der Bakterien mit einem HRP-gekoppelten Antikörper basierte auf der Messung der Lumineszenz bzw. der Umsetzung chromogener Substrate mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät. Die Quantifizierung mit dem IXM und der Software MetaXpress erfolgte hingegen bildbasiert. Das visuelle Auszählen adhärenter, markierter Bakterien unter dem Mikroskop wurde in anderen Untersuchungen bereits durchgeführt (O'Brien *et al.*, 2002; Weidenmaier *et al.*, 2004; Blickwede *et al.*, 2005). Die manuelle Auszählung per Auge ist für ein Hochdurchsatzverfahren jedoch ungeeignet. Deshalb wurde hier eine Methode entwickelt, bei der sowohl die Aufnahme der Bilder als auch die anschließende Bildanalyse in einem größtenteils automatisierten Verfahren ablaufen.

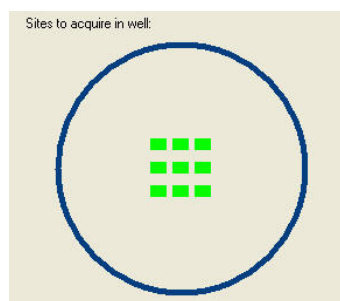
Für dieses Verfahren wurden sowohl die Zellkerne als auch die Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Markierung erfolgte ebenfalls nach Adhäsion und Fixierung. Nach Inkubation mit dem gegen die Lipoteichonsäure von *S. aureus* gerichteten Antikörper wurde mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten, grün-fluoreszierenden Antikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Dapi gefärbt. Die Markierung mit dem grün-fluoreszierenden Antikörper führte im Gegensatz zur Färbung mit FITC und Syto 9 zu guten Ergebnissen.

#### *Aufnahme der Bilder*

Die Akquise-Einstellungen zur Aufnahme der Bilder sind unter 2.2.3.4.2 beschrieben. Diese wurden zu Beginn der Messungen festgelegt, teilweise mussten sie jedoch im laufenden Screening überprüft und erneut angepasst werden.

In jedem Well wurden neun Bilder aquiriert und die Werte der Bildanalyse mit Microsoft Excel gemittelt. Durch Aufnahme mehrerer Bilder konnten Schwankungen durch ungleichmäßige Verteilung der Bakterien verringert werden. Darüber hinaus war die automatische Fokussierung nicht bei jedem Bild optimal, sodass auch die Schwankungen minimiert wurden, die sich durch diese technische Komponente ergaben.

Alle neun Bilder wurden im mittleren Bereich der Wells aufgenommen (siehe Abbildung 3-3). Bei den Waschschritten mit Absaugpumpe und Pipette löste sich am Eintauchpunkt der Absaugspitze in einigen Wells der Zellrasen. Die Absaugspitze wurde stets im Randbereich angesetzt, sodass dieser Zellverlust durch die Bildaufnahme im mittleren Bereich nicht nachteilig war.



**Abbildung 3-3: Anzahl und Position der Bilder innerhalb eines Wells (96-Well-Format)**

*Anzahl und Position der Bilder, die vom IXM akquiriert wurden. Gezeigt ist ein Ausschnitt eines Fensters der Software MetaXpress.*

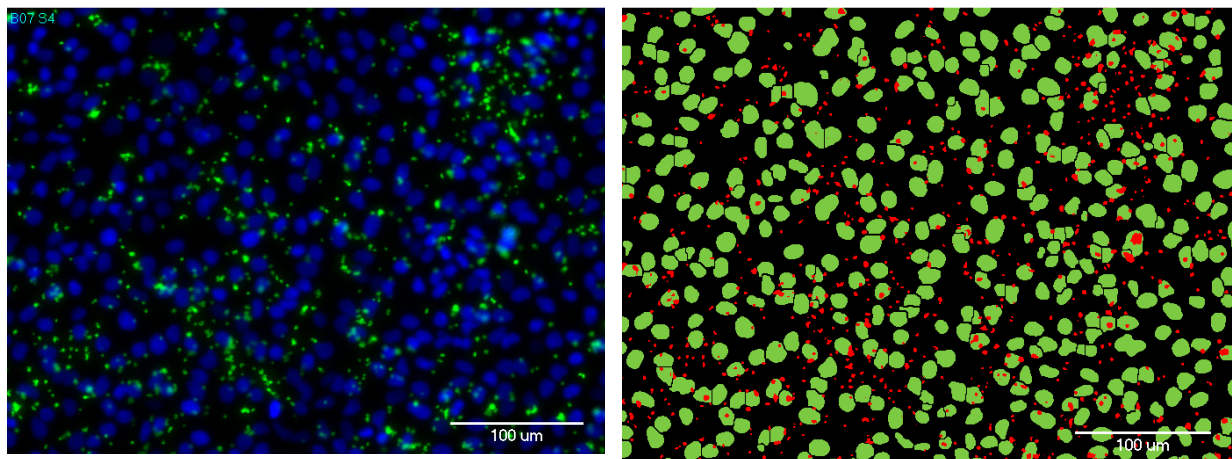
#### *Bildanalyse*

Molecular Devices bietet – je nach Anwendungsziel – verschiedene Module zur Bildanalyse an. Die Analyse der in dieser Arbeit erstellten Bilder wurde mit dem Modul Transfluor durchgeführt. Zur Veranschaulichung des Bildanalyse-Verfahrens ist in Abbildung 3-4 ein mit dem IXM erstelltes Bild gezeigt (links), das mit Transfluor analysiert wurde (rechts).

Die Anwendung dieses Moduls ist unter 2.2.3.4.3 beschrieben. Bei den Einstellungen wurden die Größe der zu erkennenden Partikel sowie die Intensitäten der Färbungen berücksichtigt. Nach Bildaufnahme war es nun möglich, die Anzahl der Zellkerne sowie die Fläche der Bakterien zu bestimmen. Diese Zahlen wurden von Transfluor tabellarisch ausgegeben.

Für den Nutzer konnten die erfassten Partikel durch farbliche Markierungen direkt im Bild sichtbar gemacht werden (Abbildung 3-4, rechts). Diese Visualisierung war sehr hilfreich, um die Einstellungen zur Erkennung der Zellkerne und der Bakterien zu optimieren und auch im laufenden Screening zu kontrollieren.

Es wurde mit dem Wert gearbeitet, der die Fläche adhärenter Bakterien pro Zelle beschrieb. Im Bild waren teilweise überdurchschnittlich große, grün-fluoreszierende Partikel sichtbar, die wahrscheinlich auf Aggregationen der Bakterien (Klumpenbildung) beruhen, eine bekannte Eigenschaft von *S. aureus*. Bei der Messung der Bakterienanzahl durch das Modul wurden solche Bakterienaggregationen oftmals als einzelnes Bakterium erfasst. Es erwies sich als geeigneter, mit der bakteriellen Fläche statt mit der Bakterienanzahl zu arbeiten.



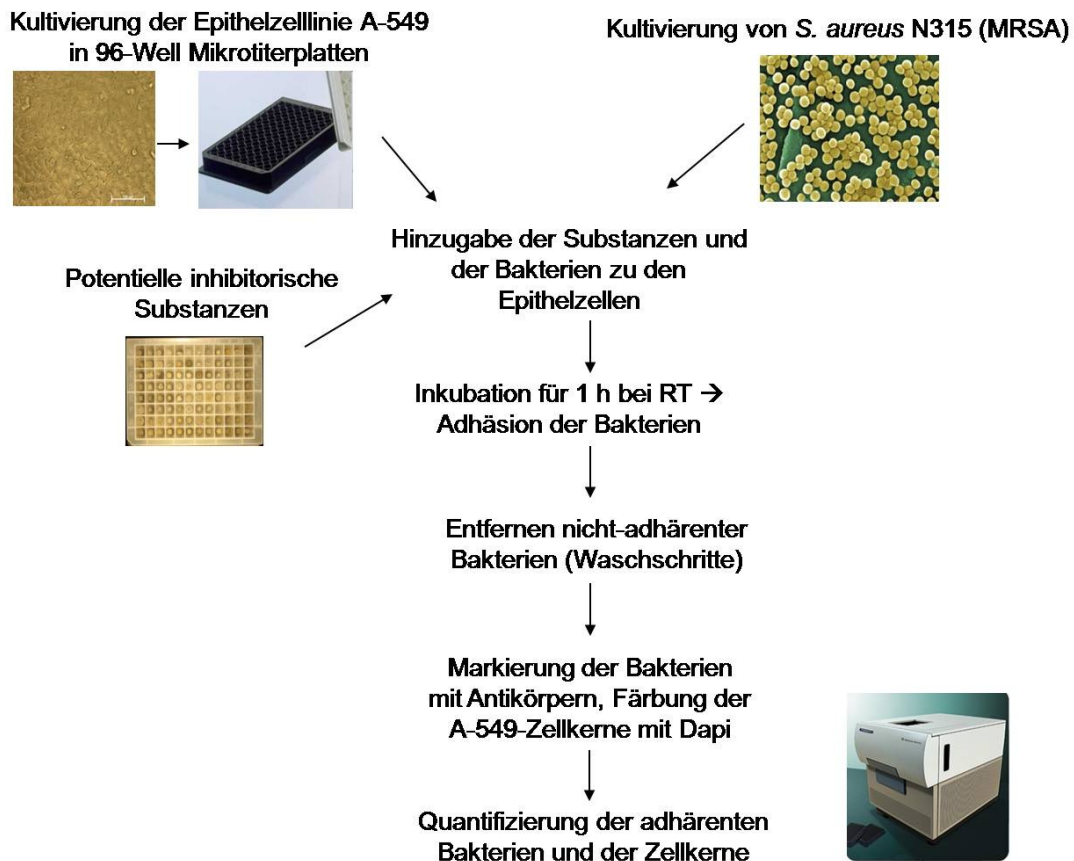
**Abbildung 3-4: Adhäsion von *S. aureus* N315 an A-549, aufgenommen und analysiert mit dem IXM und der Software MetaXpress**

Gezeigt ist ein Bild mit fluoreszenzmarkierten *S. aureus* (grün) und Dapi-gefärbten Zellkernen (blau), mit dem IXM erstellt (links). Das rechte Bild zeigt das Ergebnis der Bildanalyse mit dem Software-Modul Transfluor: in rot sind die erfassten Bakterien markiert, in grün die erfassten Zellkerne. Adhärenente Bakterien pro Epithelzelle in diesem Bild: 11,14, basierend auf der Flächenanalyse für die Bakterien.

#### 3.1.1.5 Finales Protokoll des entwickelten Adhäsionsassays

Nachdem die einzelnen Durchführungsschritte sowie Materialien und Methoden evaluiert worden waren, konnte ein finales Protokoll für den Adhäsionsassays formuliert werden. Der Ablauf mit den eingesetzten Methoden und Materialien ist in Abbildung 3-5 schematisch dargestellt und im Folgenden sind die wichtigsten Punkte kurz beschrieben.





**Abbildung 3-5: Übersicht des Ablaufschemas des etablierten Assays**

**A-549:** Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 100.000 Zellen/ml in eine 96-Well-Platte eingesät und 4-5 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Zur Durchführung des Adhäsionsexperiments wurde das verbrauchte Medium durch 75 µl Infektionsmedium ersetzt.

***S. aureus*:** Einige ml einer Übernachtskultur von *S. aureus* N315 wurden zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Wiederholung des Waschschrittes in PBS wurde das Pellet in Infektionsmedium resuspendiert unter Einstellung einer OD<sub>600</sub> von 1,0.

**Substanzzugabe:** Die Screeningsubstanzen wurden mit dem Pipettierroboter Evolution P3 von PerkinElmer (Waltham, USA) mit aufgesetztem Pintool (96 Nadeln) verteilt. Das Pintool transferiert durch Adhäsionskräfte pro Pipettievorgang ca. 70 bis 80 nl gelöster Substanz (Menge ist abhängig vom Lösungsmittel). Im Screening wurden die Substanzen in einer Endkonzentration von 20 µM zugesetzt.

**Zugabe von *S. aureus*:** Direkt im Anschluss an die Substanzzugabe zu den A-549-Zellen wurden je 25 µl der Bakteriensuspension (mit eingestellter OD<sub>600</sub> = 1,0) pro Well zugefügt (OD<sub>600</sub> im Adhäsionsassay = 0,25).

**Adhäsion:** Nach Zugabe der Bakterien erfolgte eine 1-stündige Inkubation bei RT.



*Entfernen nicht-adhärenter Bakterien:* Nach Adhäsion wurden nicht-adhärenente Bakterien mit Hilfe einer Vakuum-Absaugpumpe (mit aufgestecktem 8-Kanal-Kamm) entfernt. PBS wurde mittels einer Multidispense-Pipette zugegeben. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen.

*Fixierung:* Die Fixierung der Zellverbände erfolgte mit 4 %iger Paraformaldehydlösung in PBS für 20 min bei RT. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen.

*Markierung und Quantifizierung:* Nach Fixierung wurden adhärenente Bakterien mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper detektiert: Nach Inkubation mit einem gegen die Lipoteichonsäure von *S. aureus* gerichteten Antikörper (primärer Antikörper) wurde mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten, grün-fluoreszierenden Antikörper inkubiert. Die Zellkerne der A-549-Zellen wurden mit Dapi gefärbt. Die Quantifizierung adhärenenter Bakterien und der Zellkerne erfolgte mit dem IXM und der zugehörigen Software MetaXpress.

### 3.1.1.6 Qualitätstests des entwickelten Assays

Zur Überprüfung der Funktionalität und Stabilität des entwickelten Adhäsionsassays wurden verschiedene Qualitätstests durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden.

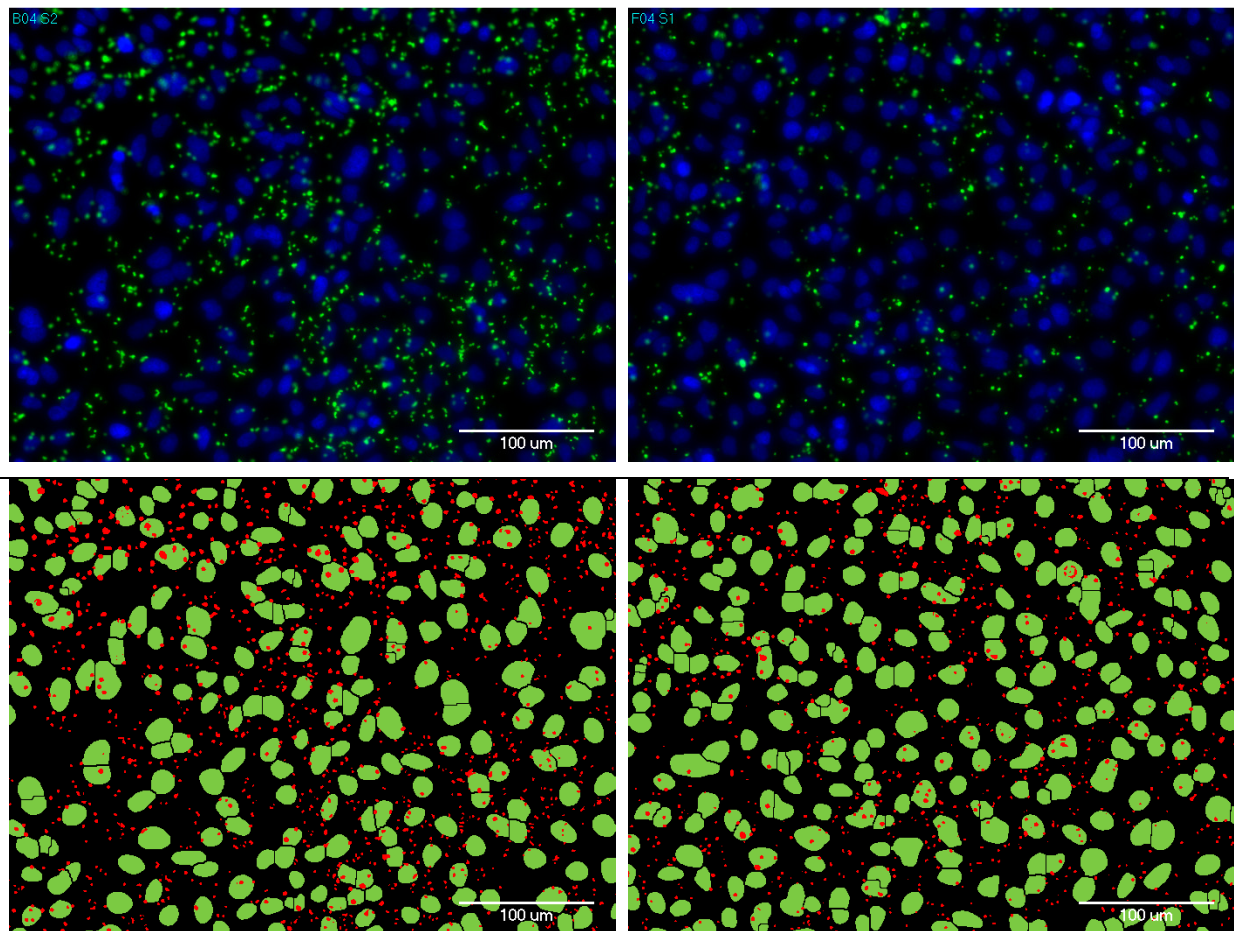
#### 3.1.1.6.1 Anwendung einer adhäsionsreduzierten Mutante

Zur Beurteilung der Funktionalität des Assays wurde die *S. aureus*-Mutante SA113  $\Delta tagO$  eingesetzt, die sich durch eine reduzierte Adhäsion auszeichnet. Diese Mutante wurde von Prof. Dr. A. Peschel (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Die Zellwand der Gram-positiven Staphylokokken weist Teichonsäuren auf, die kovalent in der Peptidoglykanschicht verankert sind. Man unterscheidet zwischen Lipoteichonsäuren und Wandteichonsäuren, wobei erstere mit der Plasmamembran gekoppelt sind und somit die komplette Peptidoglykanschicht durchdringen. Bei der Wandteichonsäure von *S. aureus* handelt es sich um komplexe Oberflächenpolymere. Diese bestehen aus ca. 40 aneinander gereihten Ribitol-Phosphat-Einheiten, modifiziert mit N-Acetylglucosamin und D-Alanin. Die Mutante *S. aureus* SA113  $\Delta tagO$  zeichnet sich durch eine fehlende Wandteichonsäure-Synthese aus. Bei Kultivierung dieser Mutante erfolgt durch Inaktivierung des Gens *tagO* keine Synthese der Wandteichonsäure mehr, da das Genprodukt essentiell für den ersten Schritt der Wandteichonsäure-Synthese ist. Es wurde gezeigt, dass die Wandteichonsäure einen wichtigen Faktor im Adhäsionsprozess darstellt (Weidenmaier *et al.*, 2004). Die Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp *in vitro* keine Einschränkung im Wachstumsverhalten (Weidenmaier *et al.*, 2008), aber eine um ca. 50 % reduzierte Adhäsion an A-549-Zellen.

In dem im Folgenden vorgestellten Adhäsionsexperiment wurden unterschiedliche Mengen von *S. aureus* SA113 bzw. von *S. aureus* SA113  $\Delta tagO$  zu den Epithelzellen gegeben. Der Adhäsionsassay wurde so wie im Screening durchgeführt. Abbildung 3-6 zeigt beispielhaft zwei Bilder des Ergebnisses dieses Experiments. Die Epithelzellen in beiden Bildern wurden mit derselben bakteriellen Menge inkubiert ( $OD_{600}$  von 0,1). Das linke Bild zeigt die Adhäsion des Wildtyps *S. aureus* SA113, das rechte Bild die Adhäsion der Mutante *S. aureus* SA113

$\Delta tagO$  nach Durchführung des Adhäsionsassays. Die quantifizierende Analyse (bakterielle Fläche pro Zelle) ergab für das links dargestellte Bild einen Wert von 25,4, für das rechts gezeigte Bild einen Wert von 14,2.

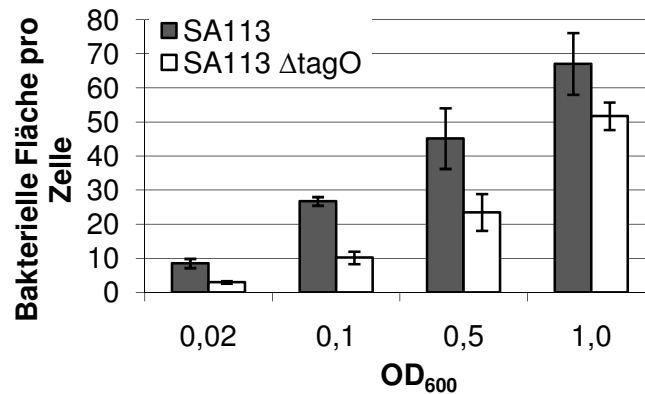


**Abbildung 3-6: Adhäsion von *S. aureus* SA113 (links) und *S. aureus* SA113  $\Delta tagO$  (rechts) im Vergleich**

Gezeigt sind zwei Bilder des Adhäsionsexperiments, die mit dem IXM aquiriert (oben) und anschließend mit Transfluor analysiert (unten) wurden.

In Abbildung 3-7 ist das Ergebnis des gesamten Adhäsionsexperiments dargestellt. Es wurden insgesamt vier verschiedene bakterielle Mengen eingesetzt. Die quantifizierende Analyse zeigte für die Mutante *S. aureus* SA113  $\Delta tagO$  eine um ca. 50 % reduzierte Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp *S. aureus* SA113. Dieses Ergebnis ist konsistent mit bereits publizierten Daten (Weidenmaier *et al.*, 2004). Lediglich bei der höchsten eingesetzten  $OD_{600}$  von 1,0 ließ sich bei diesem Adhäsionsexperiment eine geringere Reduktion als 50 % messen.

Das Ergebnis bestätigte eine funktional erfolgreiche Entwicklung des Adhäsionsassays.



**Abbildung 3-7: Adhäsion des Wildtyps *S. aureus* SA113 im Vergleich zur Adhäsion der Mutante *S. aureus* SA113  $\Delta$ tagO**

Ergebnisse der quantifizierenden Analyse von Bildern, die mit dem IXM aufgenommen und mit dem Modul Transfluor analysiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils vier Bildern.

#### 3.1.1.6.2 Einsatz einer adhäsionsinhibierenden Substanz

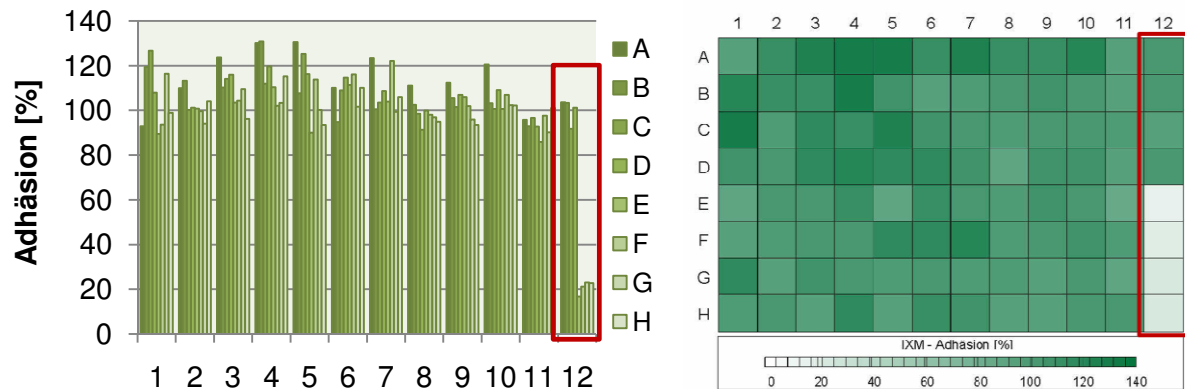
Als weitere Kontrolle zur Funktionalität des entwickelten Assays wurde Polyinosinsäure eingesetzt, eine bekannte adhäsionsinhibierende Substanz. Diese zeigte in einer anderen Untersuchung eine signifikante adhäsionsreduzierende Wirkung von *S. aureus* SA113 an humane nasale Epithelzellen bei einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml (Weidenmaier *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde bei einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml eine 80-90 %ige Adhäsionsreduktion ermittelt (siehe z. B. Abbildung 3-8). Dieses Ergebnis bestätigte ebenfalls die Funktionalität des Assays.

#### 3.1.1.6.3 Überprüfung der Gleichmäßigkeit der Werte

Bei der Durchführung eines Hochdurchsatz-Screenings ist eine möglichst geringe Schwankungsbreite der Werte wünschenswert und stellt ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Qualität dar. Zur Überprüfung der Gleichmäßigkeit der Werte über eine gesamte Mikrotiterplatte wurden Adhäsionsassays ohne Zugabe von Substanzen durchgeführt. Die vier Wells E12-H12 wurden mit 50  $\mu$ g/ml Polyinosinsäure (Poly(I)) als Positivkontrolle inkubiert (wie auch in jeder Platte im Screening). In Abbildung 3-8 ist die Gleichmäßigkeit über eine gesamte Platte beispielhaft gezeigt.

Die Werte der Wells A12-D12 wurden – wie auch im Screening – gemittelt und die Werte der anderen Wells auf diesen Mittelwert bezogen. Der Mittelwert aller Wells (A01 bis H11) lag bei 105,7 % und die Standardabweichung bei 10,2 %. Innerhalb dieser Wertemenge lag der kleinste Wert bei 86 %, das Maximum bei 131 %. Eine Reduzierung der Schwankungsbreite konnte im Rahmen dieser Arbeit und mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht erreicht werden. Insbesondere wegen dieser Schwankungsbreite wurden alle Screenings in zwei unabhängigen Durchläufen durchgeführt (siehe auch 4.1.3).



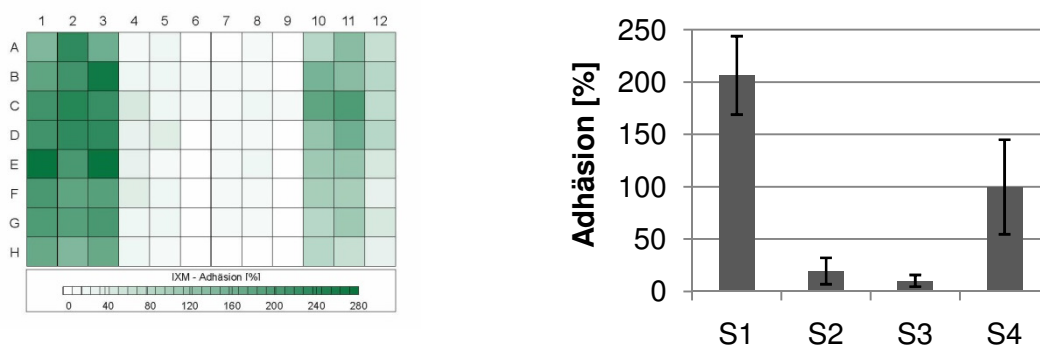
**Abbildung 3-8: Überblick über die Gleichmäßigkeit der Werte eines Adhäsionsassays, dessen Ergebnis mit Hilfe des IXM und MetaXpress erfasst wurde**

Dargestellt sind die prozentualen Werte der Adhäsion für jedes Well (Graphikformate Microsoft Excel (links) bzw. CorelChart (rechts)). Acht Wells dienten im Screening als Kontrolle (rote Kästen): Wells A12-D12 dienten als Negativkontrolle (keine Zugabe von Wirkstoffen), Wells E12-H12: Poly(I).

#### 3.1.1.6.4 Internalisierungsassay

Es wurde nachgewiesen, dass *S. aureus* in Epithelzellen eindringen kann (Hamill *et al.*, 1986; Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998). Da bei der angewendeten Quantifizierungsmethode durch die Permeabilisierung der Zellmembran auch internalisierte Bakterien miterfasst werden, wurde untersucht, ob eine Internalisierung bei der einstündigen Inkubationsperiode die Ergebnisse beeinflussen würde.

Die Durchführung ist unter 2.2.3.5 ausführlich beschrieben. Nach Inkubation mit den Bakterien wurde die MTP in vier Segmente unterteilt: Zweites und drittes Segment (S2 und S3) wurden mit 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml Lysostaphin zur Lyse adhärenter Bakterien inkubiert. Die Zellen in Segment 1 (S1) wurden sofort fixiert. Die Zellen in Segment 4 (S4) wurden so wie die Zellen in S2 und S3 behandelt, jedoch ohne Zusatz von Lysostaphin. Die weitere Fixierung, Färbung und Quantifizierung erfolgte wie bei Durchführung des Adhäsionsassays. In Abbildung 3-9 ist das Ergebnis dieses Internalisierungs-Experiments dargestellt.



**Abbildung 3-9: Ergebnis der Quantifizierung nach Durchführung des Internalisierungsassays**

Links ist das Ergebnis des Internalisierungs-Experiments als Thermogramm mithilfe der Software CorelChart dargestellt. Die graphische Darstellung rechts zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 24 Wells pro Segment/Behandlungsmethode. S1-S4: siehe Text.

Nach Behandlung mit Lysostaphin konnten nur geringe Mengen an Bakterien detektiert werden. Somit findet in der Inkubationsperiode keine bedeutungsvolle Internalisierung statt. Aus diesem Experiment geht nicht hervor, ob die geringen Restmengen intrazellulär vorlagen oder sich in adhärenter Form resistent gegen die Lysostaphinbehandlung darstellten.

### **3.1.2 Screening verschiedener Substanzsammlungen und Peptidbibliotheken**

Nach Entwicklung des Adhäsionsassays und Kontrolle von dessen Funktionalität wurden verschiedene Substanzsammlungen und Peptidbibliotheken in diesem Assay getestet (siehe 2.1.9), die in der Abteilung Chemische Biologie, HZI, zur Verfügung standen.

#### **3.1.2.1 Erläuterungen zur Vorgehensweise**

Die acht Wells der Spalte 12 wurden in jeder Platte mit Kontrollen belegt. Die Wells A12-D12 wurden mit dem Lösemittel inkubiert, in welchem die Stammlösungen der auf der Platte untersuchten Testsubstanzen vorlagen. Fast alle Substanzen lagen in DMSO gelöst vor. Bei den Kontrollen wurden dieselben Lösungsmittelkonzentrationen wie bei den Substanztestungen verwendet. Die Stammlösungen in den Screeningplatten waren unterschiedlich konzentriert. Bei der gewünschten Substanzkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  musste eine Mengenzugabe von 1  $\mu\text{l}$  nie überschritten werden (entsprechend einer maximal 1 %igen Endkonzentration an Lösungsmittel im Assay). DMSO wirkt zytotoxisch und führt konzentrationsabhängig zu Zellablösungsvorgängen. Bei Einsatz von 1 % DMSO und einer Inkubationszeit von einer Stunde konnten keine DMSO-abhängigen Zellablösungsvorgänge oder andere toxische Effekte beobachtet werden. Die Wells E12-H12 wurden mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I) als Positivkontrolle inkubiert (siehe 3.1.1.6.2).

Es erfolgten jeweils zwei Screeningdurchläufe, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Die Messwerte aus diesen beiden Screeningdurchläufen wurden für jede Substanz gemittelt und die Standardabweichungen dieser beiden Mittelwerte errechnet. Bei der Darstellung der prozentualen Adhäsion wurde der Bezug jeweils zu der Lösemittelkontrolle derselben Platte gesetzt: Der Mittelwert der Lösemittelkontrolle wurde mit 100 % Adhäsion gleichgesetzt und die bakterielle Adhäsion unter Einfluss der Testsubstanzen darauf bezogen.

Für die weitere Datenerhebung wurde die Definition der Treffersubstanzen (Hits) festgelegt. Die Grenze für die Substanzen, die als Hits bezeichnet wurden, lag bei einer mindestens 30 %igen Reduktion der Adhäsion (unter Betrachtung des Mittelwerts). Viele dieser so definierten Hits wiesen bei einem der beiden Screening-Durchläufe eine mindestens 40 %ige Reduktion auf.

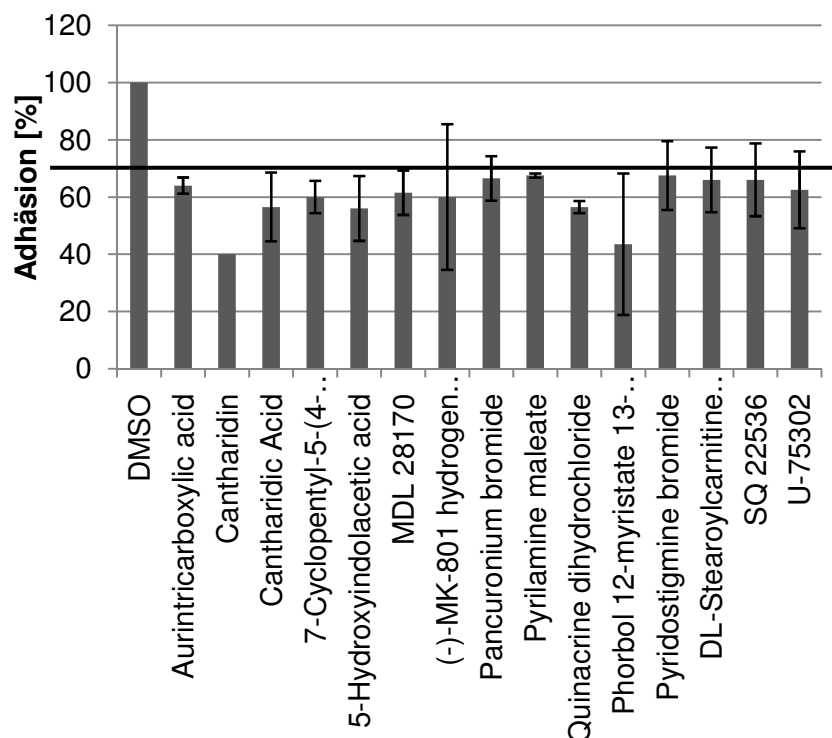
#### **3.1.2.2 Ergebnisse der Screening-Experimente**

*Sammlung von Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien* (Bestand: 117 Substanzen): Das Screenen dieser Sammlung identifizierte keine adhäsionsinhibierenden Verbindungen. Eine Messung der MTPs mit einem MTP-Lesegerät zeigte in einigen Wells eine starke Reduktion

der Fluoreszenz (485/530nm), allerdings zeigten die Bilder des IXM Zellablösungen in diesen Wells. Bei dem Screenen dieser Sammlung wurden die Vorteile der bildbasierten Quantifizierungsmethode besonders herausgestellt (siehe 4.1.2).

*Peptid-Bibliotheken* (Bestand: 1083 Peptide bzw. Peptidmischungen): Die Untersuchung dieser Bibliotheken identifizierte zwei Peptide als Hits, die zur Verifizierung der Aktivität nachsynthetisiert wurden. Es handelte sich um zwei zyklische Peptide mit der Struktur [a-a-r-r-a-a-c] und [a-a-r-k-a-a-c], synthetisiert aus D-Aminosäuren.

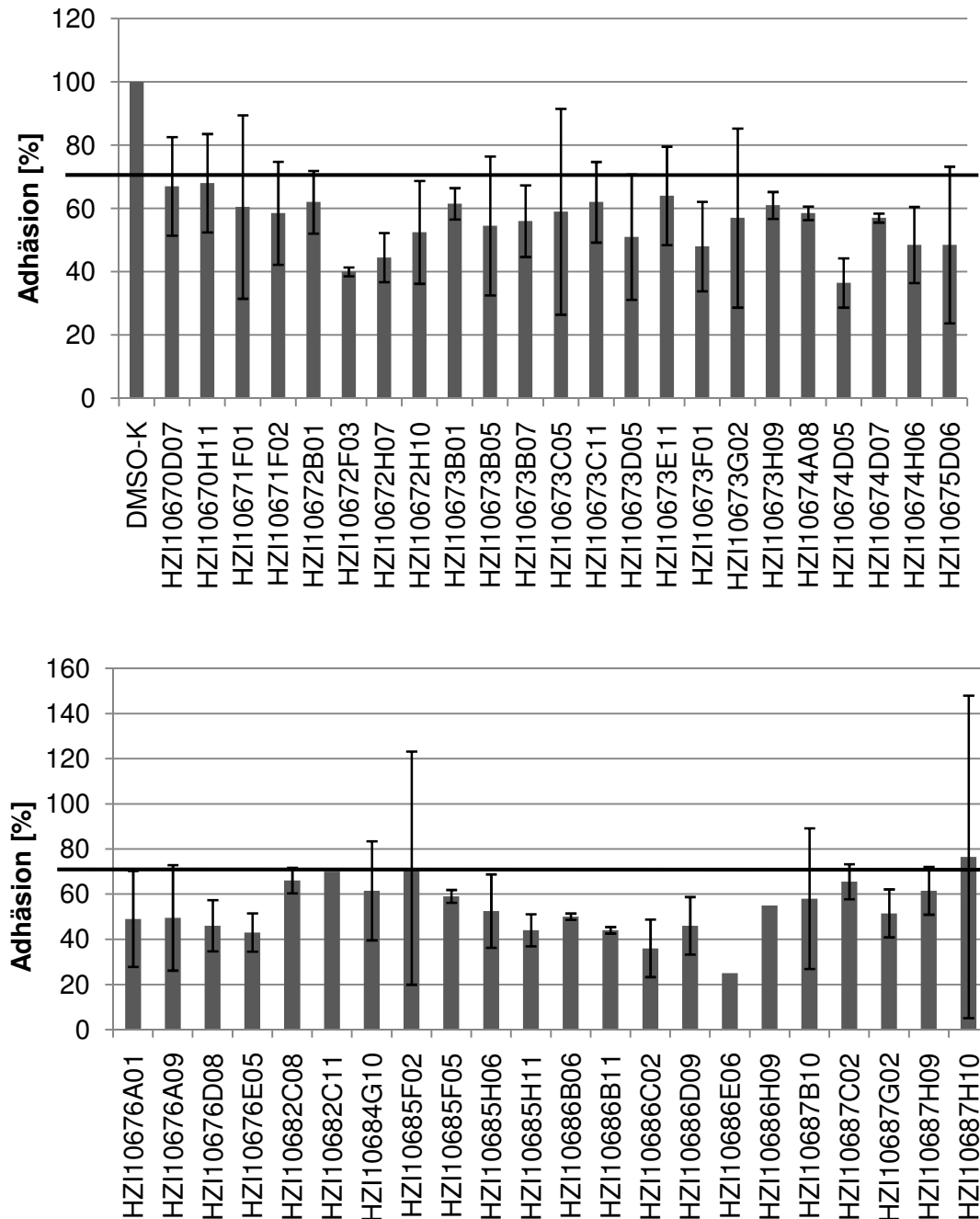
*Lopac-Sammlung* (Bestand: 1408 Substanzen): Das Screenen der Lopac-Sammlung ergab insgesamt 15 Hits. Die Trefferquote lag somit bei 1,07 %. In Abbildung 3-10 sind alle Hits aufgeführt und die prozentuale Adhäsion graphisch dargestellt.



**Abbildung 3-10: Hits der Lopac-Sammlung**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Die Linie kennzeichnet den festgelegten Schwellenwert (siehe Text).

*Var-Sammlung* (Bestand: ca. 1600 Substanzen): Das Screenen der Var-Sammlung ergab 45 Hits. Dies entspricht einer Trefferquote von 2,81 %. Diese sind in Abbildung 3-11 gezeigt.



**Abbildung 3-11: Hits der Var-Sammlung**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Die Linie kennzeichnet den festgelegten Schwellenwert (siehe Text).

Die Mittelwerte von zwei in Abbildung 3-11 aufgeführten Verbindungen lagen leicht oberhalb des festgesetzten Schwellenwertes. An den sehr hohen Standardabweichungen ist zu erkennen, dass die Werte der beiden unabhängigen Experimente stark voneinander abwichen: Bei Verbindung HZI10685F02 lag der Wert beim ersten Screening-Durchlauf bei 108 % – folglich also eine unauffällige Substanz – jedoch beim zweiten Screeningdurchlauf bei 35 %. Bei Verbindung HZI10687H10 wurde eine Adhäsion von 127 % sowie von 26 % ermittelt. Da die Werte jeweils beim zweiten Screeningdurchlauf überdurchschnittlich auffällig

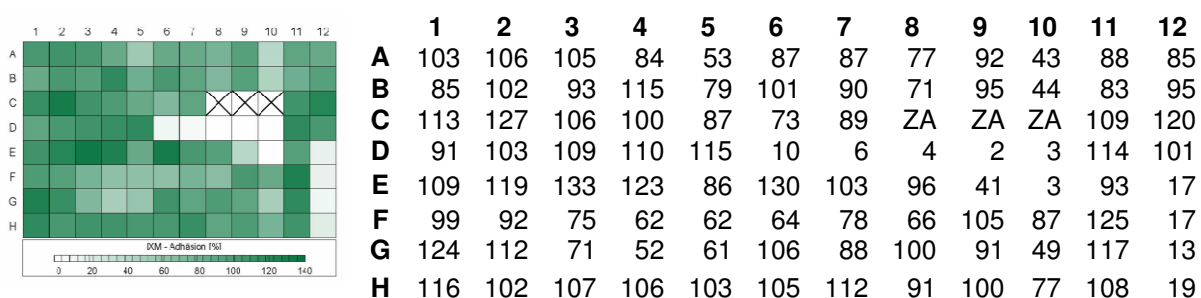
waren, wurden diese beiden Verbindungen auch als Hit gekennzeichnet, um sie im Verifizierungsprozess noch einmal zu testen.

### 3.1.3 Untersuchung der Aktivitäten der Hit-Substanzen

Die adhäsionsinhibierenden Aktivitäten der insgesamt 62 Hits aus dem Screening wurden in weiteren Adhäsionstests untersucht. Dazu wurde nicht mit den Substanzen aus den Screeningplatten, sondern mit Nachsubstanzen gearbeitet (siehe 4.1.3). Die Hits der Var-Sammlung, die durch Kollaborationen mit verschiedenen Chemikern angelegt wurde, wurden teilweise erneut von den Chemikern angefordert. In vielen Fällen war noch Substanz als Feststoff in den Lagerbeständen vorhanden, sodass auf diese zurückgegriffen wurde. Alle Verbindungen, die kommerziell erhältlich waren, wurden erneut bezogen. Die beiden als Hit definierten Peptide wurden von der Peptid-Synthese-Plattform des HZI, Abteilung Chemische Biologie, erneut synthetisiert, sowohl in Form zyklischer als auch linearer Peptide.

Die Nachsubstanzen wurden im etablierten Adhäsionsassay getestet. Dieser wurde wie beschrieben durchgeführt, jedoch wurden die Substanzen nicht mit dem Pipettierroboter, sondern manuell mit der Pipette zugegeben. Es wurden fünf verschiedene Konzentrationen getestet, um die Aktivität zu verifizieren sowie weitere Informationen über die aktiven Konzentrationsbereiche der Hit-Substanz zu erhalten. Dazu wurden Verdünnungsstufen der Substanzen in einer separaten Platte pipettiert und diese Verdünnungen direkt aus der Platte auf die Zellen gegeben.

Abbildung 3-12 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer 96-Well-Platte, in der 16 verschiedene Substanzen getestet wurden. Jede Substanz wurde in fünf Konzentrationen untersucht (5, 10, 20, 50 und 100  $\mu\text{M}$ ). Substanz 1 wurde in Reihe A in den Wells A01-A05 getestet, mit steigender Konzentration von links nach rechts. Die anderen Substanzen wurden nach gleichem Schema angeordnet (Substanz B in Wells B01-B05 usw.). Spalte 11 wurde nicht belegt.



**Abbildung 3-12: Untersuchung der Aktivitäten der Hit-Substanzen**

Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Adhäsionswerte (bezogen auf die Werte der Lösemittelkontrolle). Belegung: siehe Text. Wie im Screening wurde zu den Wells A12- D12 DMSO, zu den Wells E12-H12 Poly(I) als Kontrolle gegeben. ZA: Zellablösung. Rechts sind die Werte aufgeführt, links sind diese mittels eines Thermogramms (Software CorelChart) visualisiert.

Die Substanz in D06-D10 zeigte starke Aktivität, auch unter Einsatz der niedrigsten Konzentration (siehe Abbildung 3-12). Die Verbindung in C06-C10 verursachte in höheren



Konzentrationen Ablösungen der Epithelzellen vom Wellboden. Die Substanz in den Wells E06-E10 zeigte bei den niedrigeren eingesetzten Konzentrationen keine effektive Reduktion der Adhäsion, jedoch ließ sich bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine Reduktion um nahezu 100 % ermitteln. Bei 50  $\mu\text{M}$  wurde hier eine Reduktion um ca. 60 % verzeichnet. Einige andere Substanzen zeigten ebenfalls bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine gute Wirksamkeit, jedoch nahm diese Wirksamkeit bei niedrigeren Konzentrationen ( $\leq 50 \mu\text{M}$ ) sehr deutlich ab (siehe z. B. A01-05, A06-A10, B06-B10). Einige Substanzen zeigten keine Aktivitäten, auch unter Einsatz der höchsten Konzentrationen (z. B. H01-H05, D01-D05).

### 3.1.4 Ergebnisse der Nachuntersuchungen der Hits

Die adhäsionsinhibierende Aktivität der 62 Treffersubstanzen wurde unter Anwendung von Nachsubstanzen in Folge-Adhäsionstests überprüft (siehe 3.1.3). Zudem wurden alle Hits auf antibakterielle Wirkung gegen den bakteriellen Screening-Stamm *S. aureus* N315 getestet. Aufgrund der Ergebnisse dieser Folgetests erwiesen sich 59 der 62 Substanzen für weiterführende Tests im Rahmen dieses Projekts als ungeeignet. Anhand der Ergebnisse der Folgetests können die Substanzen in vier Gruppen unterteilt werden:

1) *Keine Verifizierung der Aktivität*: 22 der Substanzen zeigten unter Einsatz von erneut bezogener Substanz keine bzw. keine herausragende Aktivität mehr (siehe Tabelle 3-1). Eine antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* N315 konnte bei diesen 22 Substanzen nicht festgestellt werden.

**Tabelle 3-1: Substanzen, die erneut bezogen keine signifikante Aktivität zeigten**

Name der Substanz	Reduktion der Adhäsion bei Inkubation mit	
	100 $\mu\text{M}$ [%]	50 $\mu\text{M}$ [%]
Cantharidic Acid*	-	-
5-Hydroxyindolacetic acid*	15	15
MDL 28170*	10	-
(-)-MK-801 hydrogen maleate*	10	-
Pancuronium bromide*	-	-
Pyridostigmine bromide*	-	-
Pyrilamine maleate*	30	-
SQ 22536*	-	-
HZI10670H11°	-	-
HZI10671F01°	15	-
HZI10671F02°	-	-
HZI10672B01°	20	-
HZI10674H06°	20	-
HZI10687G02°	20	10

Name der Substanz	Reduktion der Adhäsion bei Inkubation mit	
	100 $\mu\text{M}$ [%]	50 $\mu\text{M}$ [%]
HZI10687H09°	20	20
HZI10687H10°	-	-
HZI10682C11°	20	-
HZI10684G10°	-	10
HZI10685F05°	10	-
HZI10685H06°	-	-
HZI10685H11°	10	10
HZI10686B11°	10	-

*Die Substanzen stammen ursprünglich aus der Lopac-(\*) bzw. der Var-(°)Sammlung*

Auch die Inkubation mit den beiden nachsynthetisierten Peptiden zeigte bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine Verminderung der Adhäsion.

2) *Antibakterielle Wirksamkeit gegen S. aureus N315*: Die antibakterielle Wirkung wurde in 96-Well-Platten anhand steigender Konzentrationen der Substanzen ermittelt (siehe 2.2.1.4). 27 der Substanzen erwiesen sich als antibakteriell wirksam gegen den Screeningstamm (siehe Tabelle 3-2). Bei diesen Substanzen ist es somit möglich, dass die ursprüngliche Identifizierung als Hit nicht (nur) auf einer Inhibierung der Interaktion zwischen den Epithelzellen und *S. aureus* beruht, sondern – zumindest teilweise – durch die antibakterielle Wirksamkeit vermittelt wird. Jedoch konnte bei einigen antibakteriell wirksamen Substanzen die verminderte Adhäsion von *S. aureus* nicht verifiziert werden. Auf diese Substanzen trifft also gleichermaßen die Klassifizierung *Keine Verifizierung der Aktivität* (Gruppe 1) zu. Bei diesen Verbindungen lag die antibakterielle Aktivität  $\geq 12,3 \mu\text{M}$ . Die Substanz HZI10686C02 erwies sich unter den untersuchten Substanzen als antibakteriell Aktivste gegen *S. aureus* N315 (Konzentration 150 nM). Bei vier weiteren Substanzen konnten antibakterielle Aktivitäten im Bereich von 0,5-2  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Die Strukturen der Substanzen können aus patentrechtlichen Gründen in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

**Tabelle 3-2: Substanzen mit antibakterieller Wirkung gegen *S. aureus* N315**

Name der Substanz	Antibakteriell gegen <i>S. aureus</i> N315 [ $\mu\text{M}$ ]	Reduktion der Adhäsion bei Inkubation mit	
		100 $\mu\text{M}$ [%]	50 $\mu\text{M}$
7-Cyclopentyl-5-(4-phenoxy)phenyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine*	$\geq 12,3$	30-40	30
Quinacrine dihydrochloride*	$\geq 37,0$	-	-
Phorbol 12-myristate 13-acetate*	$\geq 4,1$	55	40
HZI10672F03°	$\geq 12,3$	50-60	10

Name der Substanz	Antibakteriell gegen <i>S. aureus</i> N315 [ $\mu\text{M}$ ]	Reduktion der Adhäsion bei Inkubation mit	
		100 $\mu\text{M}$ [%]	50 $\mu\text{M}$
HZI10672H07°	$\geq 12,3$	10	10
HZI10672H10°	$\geq 12,3$	10	-
HZI10673B01°	$\geq 4,1$	50	15
HZI10673B05°	$\geq 4,1$	50-60	10
HZI10673C05°	$\geq 12,3$	20	20
HZI10673C11°	$\geq 37,0$	20	10
HZI10673E11°	$\geq 4,1$	30	20
HZI10673F01°	$\geq 4,1$	30	10
HZI10673G02°	$\geq 12,3$	20	-
HZI10673H09°	$\geq 37,0$	20	10
HZI10674A08°	$\geq 12,3$	20	20
HZI10674D05°	$\geq 12,3$	40-50	10
HZI10674D07°	$\geq 1,37$	15	-
HZI10675D06°	$\geq 37,0$	40	40
HZI10676A01°	$\geq 111,1$	40	40
HZI10676A09°	$\geq 37,0$	-	-
HZI10676E05°	$\geq 4,1$	80-90	70
HZI10682C08°	$\geq 37,0$	30-40	30
HZI10686B06°	$\geq 12,3$	20	-
HZI10686C02°	$\geq 0,15$	50	30
HZI10686D09°	$\geq 0,46$	50	40
HZI10686H09°	$\geq 1,37$	75	10
HZI10687C02°	$\geq 0,46$	60-70	70

*Die Substanzen stammen ursprünglich aus der Lopac-(\*) bzw. der Var-()Sammlung*

Die antibakteriellen Aktivitäten der hier untersuchten Substanzen sind sehr interessante Nebenfunde und sollten in künftigen Studien weiter verfolgt werden (siehe Kapitel 5). In der vorliegenden Arbeit wurde diesem Aspekt nicht nachgegangen.

3) *Verursachung von Zellablösungsvorgängen:* Vier der Substanzen zeigten bei Inkubation mit höheren Konzentrationen (insbesondere bei 100  $\mu\text{M}$ ) als im Screening (20  $\mu\text{M}$ ) eine starke Wirkung auf die Morphologie der Epithelzellen (siehe Tabelle 3-3). Zellablösungsvorgänge wurden beobachtet. Drei der vier aufgeführten Substanzen waren außerdem antibakteriell wirksam gegen *S. aureus* N315.

**Tabelle 3-3: Substanzen, die zu Ablösungen der A-549-Zellen vom MTP-Boden führten**

Name der Substanz	Antibakteriell gegen <i>S. aureus</i> N315 [ $\mu\text{M}$ ]	Beobachtung bei Inkubation mit 100 $\mu\text{M}$	Reduktion der Adhäsion bei Inkubation mit 50 $\mu\text{M}$ [%]
Cantharidin*	-	Zellverlust	Zellverlust
HZI10673B07°	$\geq 1,37$	Zellverlust	20
HZI10673D05°	$\geq 37,0$	Zellverlust	-
HZI10685F02°	$\geq 37,0$	Zellverlust	-

*Die Substanzen stammen ursprünglich aus der Lopac-(\*) bzw. der Var-(°)Sammlung*

4) *Nachsubstanz nicht verfügbar*: Vier der Substanzen konnten aus verschiedenen Gründen nicht erneut vom Hersteller bezogen werden (siehe Tabelle 3-4), sodass mit diesen keine Folgeuntersuchungen durchgeführt werden konnten.

**Tabelle 3-4: Substanzen, die nicht erneut bezogen werden konnten**

Name der Substanz	Bemerkung
DL-Stearoylcarnitine chloride*	nicht mehr kommerziell erhältlich
U-75302*	ein kommerzieller Bezug war preislich nicht zu rechtfertigen
HZI10670D07°	keine Nachsubstanz verfügbar
HZI10686E06°	keine Nachsubstanz verfügbar

*Die Substanzen stammen ursprünglich aus der Lopac-(\*) bzw. der Var-(°)Sammlung*

*Fazit*: Von den 62 Substanzen, die im Screening eine Wirksamkeit zeigten, blieben aufgrund der oben aufgeführten Gründe drei Substanzkandidaten für weitere Studien interessant (siehe Tabelle 3-5).

**Tabelle 3-5: Substanzkandidaten**

Name der Substanz	Reduktion der Adhäsion bei Inkubation mit [%]	
	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
Aurintrinsicarbonsäure (ATA)*	> 90	> 90
HZI10676D08°	75	70
HZI10687B10°	> 90	50

*Die Substanzen stammen ursprünglich aus der Lopac-(\*) bzw. der Var-(°)Sammlung*

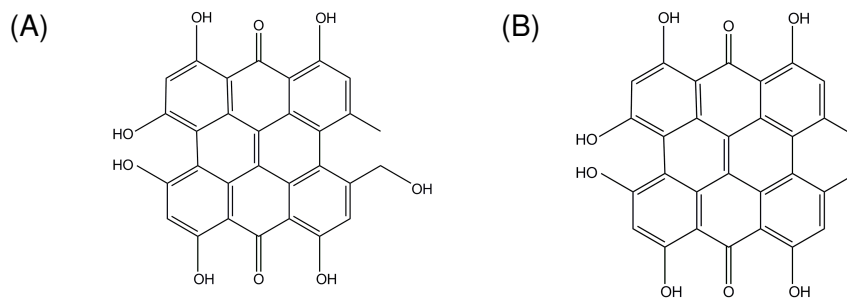
Bei diesen drei Substanzen ließ sich die adhäsionsinhibierende Aktivität verifizieren, ohne dass Zellablösungsvorgänge oder eine antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* N315 gefunden wurden.

Die Wirkung der beiden aktivsten Wirkstoffkandidaten Aurintrinsicarbonsäure und HZI10687B10 wurde in Folgeexperimenten weiter charakterisiert. Diese Untersuchungen sind im Folgenden vorgestellt. Eine erste Abgrenzung des Wirkspektrums von HZI10676D08 zeigte eine 50 %ige Reduktion der Adhäsion bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$ . Weitere vorläufige Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass eine stärkere Adhäsionsreduktion als 75 % auch

bei zunehmender Substanzkonzentration nicht erreicht werden konnte (maximal eingesetzte Konzentration 100  $\mu\text{M}$ ). Der vorläufig ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 30  $\mu\text{M}$  für HZI10676D08 liegt unterhalb des Wertes des Substanzkandidaten HZI10687B10 (siehe unten, 3.1.6.1). Da auch die Verfügbarkeit dieser Verbindung problematisch war, wurde sie nicht in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

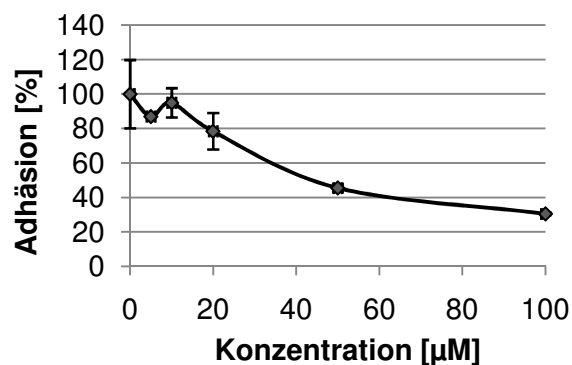
### 3.1.5 Exkurs: Substanz HZI10687B10

Bei dem Substanzkandidaten mit der Nummer HZI10687B10 handelt es sich um den Naturstoff Pseudohypericin. Im Folgenden wird die Bezeichnung Pseudohypericin (PSH) statt HZI10687B10 verwendet. Diese Substanz wurde von Prof. Dr. Höfle (ehemals HZI) bereit gestellt. Zu Vergleichszwecken wurde auch das strukturverwandte Hypericin, ebenfalls bereitgestellt von Prof. Dr. Höfle, auf adhäsionsinhibitorische Eigenschaften getestet. Die Struktur des Pseudohypericins unterscheidet sich nur durch das Vorliegen eines zusätzlichen Sauerstoffmoleküls von der des Hypericins (siehe Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-13: Pseudohypericin (A) und Hypericin (B)**

Abbildung 3-14 zeigt das Ergebnis der Untersuchung des Hypericins im Adhäsionsassay.



**Abbildung 3-14: Adhäsion von *S. aureus* N315 unter Inkubation mit Hypericin**

Die gezeigten Ergebnisse wurden unter Anwendung des Adhäsionsassays erhoben. Für jede Konzentration wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

Der Vergleich des aktiven Konzentrationsbereiches von Hypericin mit dem des Pseudohypericins zeigt sehr ähnliche Aktivitäten (vgl. Abbildung 3-16 (B)). Bei Testung des Hypericins auf antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* N315 wurde ein MHK-Wert von 12,3  $\mu\text{M}$  ermittelt. Es konnte keine antibakterielle Aktivität des Pseudohypericins gegen

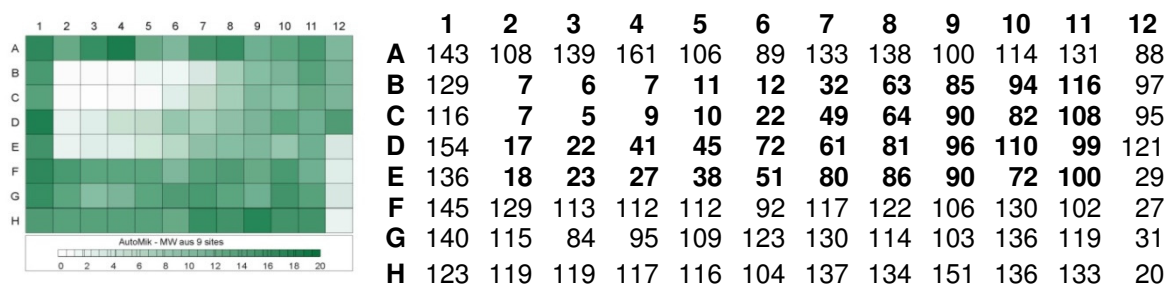
*S. aureus* bis zu einer eingesetzten Konzentration von 111,1  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Diese Eigenschaft unterscheidet Hypericin somit von Pseudohypericin. Aufgrund der mangelnden Selektivität bezüglich adhäsionsinhibitorischer Wirkung wurden in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Studien mit Hypericin durchgeführt.

### 3.1.6 Weitere Charakterisierung der Wirkstoffkandidaten Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin

#### 3.1.6.1 Erhebung des Wirkspektrums

Zunächst wurden die adhäsionsinhibierenden Wirkungen der beiden Wirkstoffkandidaten Aurintricarbonsäure (ATA) und Pseudohypericin (PSH) unter Anwendung des Adhäsionsassays erneut konzentrationsabhängig untersucht. Dabei dienten die Ergebnisse aus der Überprüfung der Aktivität der Hits (siehe 3.1.3) der Auswahl der hier eingesetzten Konzentrationsstufen.

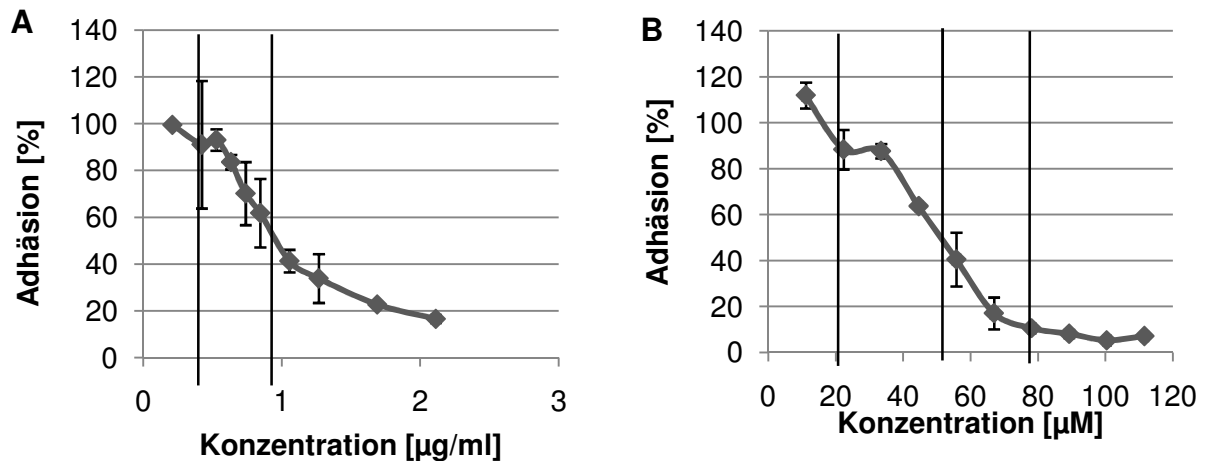
Abbildung 3-15 zeigt die Ergebnisse dieses Adhäsionsexperiments.



**Abbildung 3-15: Aktivitätsmessung von Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin**

Pro Substanzkonzentration wurden Doppelbestimmungen erhoben. Reihen B und C zeigen das Ergebnis der Adhäsion unter Inkubation mit PSH, Reihen D und E unter Inkubation mit ATA. Die Substanzmenge nimmt von links nach rechts ab. Konzentrationen: Reihe B+C, Spalte 2-11: 112 bis 11,16  $\mu\text{M}$ . Reihe D+E: Spalte 2-11: 2,11 bis 0,21  $\mu\text{g/ml}$ . Wie im Screening wurden die Wells A12-D12 mit DMSO, die Wells E12-H12 mit Poly(I) inkubiert. Die anderen Wells haben keinen Zusatz. Rechts: Prozentuale Adhäsionswerte, links: Thermogramm dieser Adhäsionswerte.

Abbildung 3-16 zeigt eine graphische Darstellung der konzentrationsabhängigen Aktivitäten. Anhand der Messwerte wurden die  $\text{IC}_{10}$ -,  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{IC}_{90}$ -Werte ermittelt, die in Abbildung 3-16 durch eingezeichnete Linien markiert und in Tabelle 3-6 aufgeführt sind.



**Abbildung 3-16: Adhäsion von *S. aureus* N315 unter Inkubation mit ATA (A) bzw. PSH (B)**

Die eingezeichneten Linien markieren die IC<sub>10</sub>-, die IC<sub>50</sub>- und die IC<sub>90</sub>-Werte, die anhand der Daten dieses Experiments ermittelt wurden.

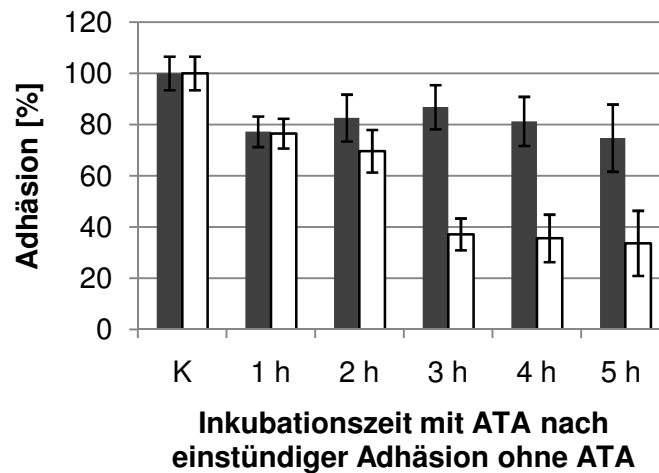
**Tabelle 3-6: IC<sub>10</sub>-, IC<sub>50</sub>- und IC<sub>90</sub>-Werte der zwei Wirkstoffkandidaten**

Name der Substanz	IC <sub>10</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>
Aurintricarbonsäure	~0,45 µg/ml	0,95 µg/ml	~2,2 µg/ml (extrapoliert)
Pseudohypericin	20 µM	51 µM	80 µM

Aurintricarbonsäure zeigt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,95 µg/ml eine weitaus stärkere Aktivität als Pseudohypericin. Die aktiven Konzentrationen von Pseudohypericin im zweistelligen mikromolaren Bereich sind für einen potentiellen Wirkstoffkandidaten relativ hoch. Pseudohypericin war trotzdem weiter von großem Interesse für diese Arbeit (siehe auch 4.1.3), denn diese Substanz vermittelte nicht nur eine Reduzierung der Adhäsion, sondern zeigte das Potential zur nahezu vollständigen Adhäsionsinhibierung.

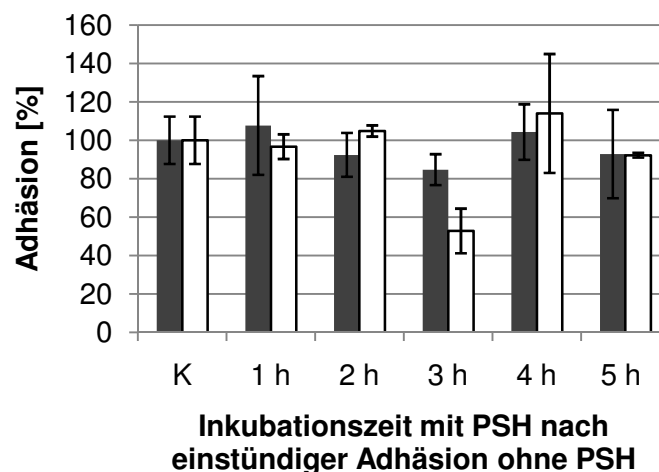
### 3.1.6.2 Wirkung von ATA und PSH auf adhärente *S. aureus*

Bei Durchführung des Adhäsionsassays wurden die Substanzen bzw. Peptide gleichzeitig mit *S. aureus* N315 zu den A-549-Zellen gegeben. Im folgenden Experiment wurde *S. aureus* N315 zunächst 1 h bei RT ohne Wirkstoffe mit den Epithelzellen inkubiert, um mit *S. aureus* besiedelte Epithelzellen vorliegen zu haben. Im Anschluss an diese Adhäsion wurde 3 mal mit PBS gewaschen, um alle nicht-adhärenenten Bakterien zu entfernen. Dann wurden ATA und PSH in den Endkonzentrationen 0,95 µg/ml und 2,2 µg/ml (IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub>-Werte für ATA) bzw. 51 µM und 80 µM (IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub>-Werte für PSH) zugegeben und die Menge adhärenenten *S. aureus* N315 nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18 zeigen die Ergebnisse.



**Abbildung 3-17: Wirkung von ATA auf mit *S. aureus* besiedelte A-549-Zellen**

Erfasst wurden die adhärenenten *S. aureus* nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h Inkubation mit 0,95 µg/ml ATA (schwarze Balken) bzw. 2,2 µg/ml ATA (weiße Balken). Zu jedem Zeitpunkt wurden Negativ-Kontrollen erhoben (Inkubation mit den entsprechenden Mengen DMSO) und die ermittelte Adhäsion jedes Zeitpunktes auf die entsprechende Kontrolle bezogen.



**Abbildung 3-18: Wirkung von PSH auf mit *S. aureus* besiedelte A-549-Zellen**

Erfasst wurden die adhärenenten *S. aureus* nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h Inkubation mit 51 µM PSH (schwarze Balken) bzw. 80 µM PSH (weiße Balken). Zu jedem Zeitpunkt wurden Negativ-Kontrollen erhoben (Inkubation mit den entsprechenden Mengen DMSO) und die ermittelte Adhäsion jedes Zeitpunktes auf die entsprechende Kontrolle bezogen.

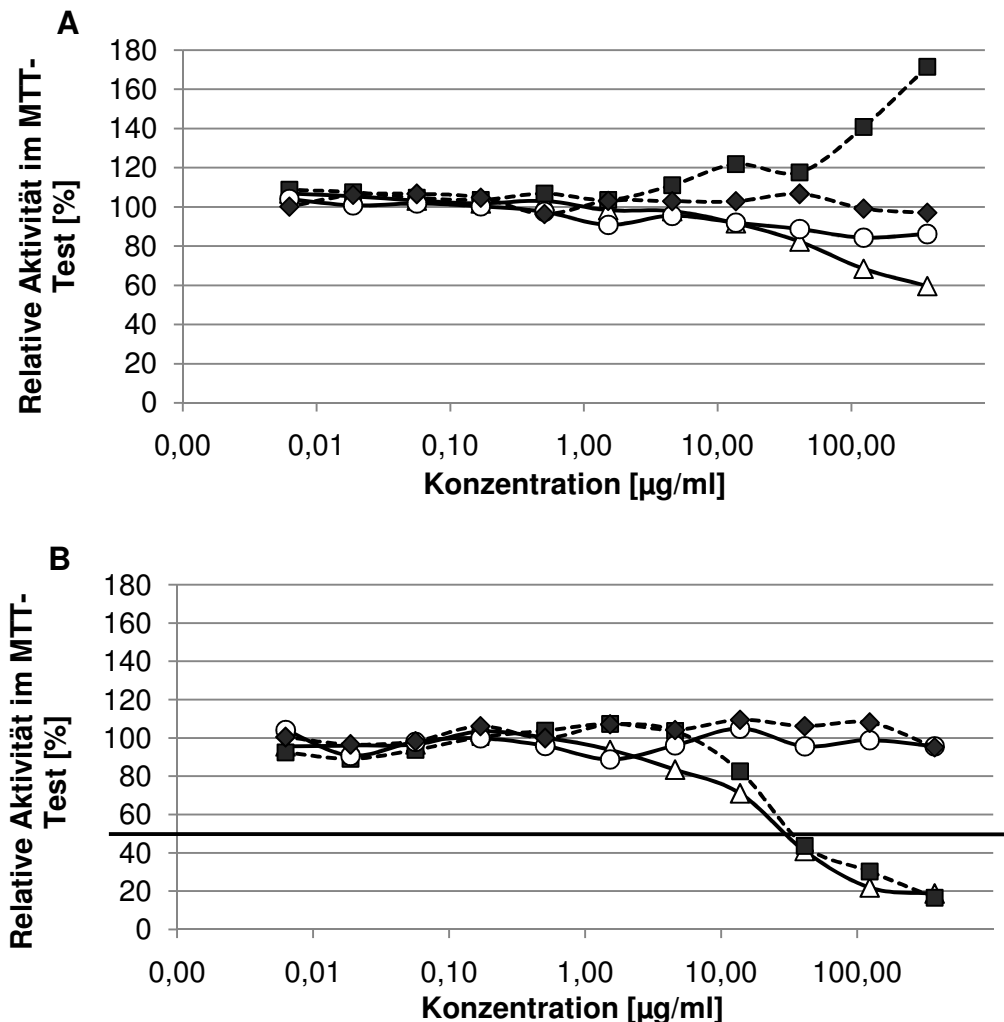
Die Inkubation mit ATA zeigte eine zeit- sowie konzentrationsabhängige Reduktion der Adhäsion von *S. aureus* N315. Mit einer Konzentration von 0,95 µg/ml ATA konnte eine maximale Adhäsionsreduktion von 25 % (nach 5 h Inkubation) gemessen werden. Unter Inkubation mit 2,2 µg/ml ATA wurde nach 3 h eine deutliche Adhäsionsreduktion von über 63 % ermittelt.

PSH zeigte im Gegensatz zu ATA im untersuchten Zeitraum keine Wirkung auf adhärenente *S. aureus*.



### 3.1.6.3 Einfluss der Wirkstoffe auf die Vitalität der Epithelzellen

In einem Proliferationstest wurde der Einfluss der beiden Wirkstoffe auf die Vitalität der A-549-Zellen untersucht. Dazu wurden nach Inkubationszeiten von 24 h und 5 Tagen MTT-Tests wie unter 2.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Abbildung 3-19 zeigt die Ergebnisse dieser Tests.



**Abbildung 3-19: Vitalitätstests mit Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin**

Die Kurven beschreiben die Vitalität der A-549-Zellen nach 24 h (Abbildung A) bzw. fünf Tagen (Abbildung B) Inkubation mit steigenden Konzentrationen ATA (durchgezogene Linie,  $\Delta$ ) bzw. PSH (gestrichelte Linie,  $\blacksquare$ ). Die Behandlungen der Zellen mit den entsprechenden Mengen Lösemittel dienten als Kontrollen (Kontrolle ATA: durchgezogene Linie,  $\circ$ ; Kontrolle PSH: gestrichelte Linie,  $\blacklozenge$ ).

Nach einem Inkubationszeitraum von 24 h können Aussagen über die akute Toxizität einer Substanz gemacht werden. Um darüber hinaus eine Aussage über mögliche proliferationsinhibierende Eigenschaften und längerfristige Toxizitäten zu erheben, wurden die Wirkstoffe über mehrere Tage mit den Zellen inkubiert.

Das Ergebnis des Vitalitätstests nach 24 h für PSH zeigt keine Wirkung auf die Zellen. Im Gegenteil zeigt die Betrachtung der Messwerte sogar einen Anstieg der Absorptionswerte, allerdings ist dies wahrscheinlich auf die rot-violette Eigenfärbung des Pseudohypericins zurückzuführen, die bei der Messwellenlänge des Assays von 595 nm mit erfasst wurde.

Nach fünf Tagen war bei einer Konzentration über 4,6 µg/ml (entspricht 8,84 µM) eine Wirkung auf die Zellen zu beobachten. Ab dieser Konzentration aufwärts bis 100 µg/ml war die Reduktion der relativen Aktivität proportional zur Menge an zugegebener Substanz. Der IC<sub>50</sub>-Wert lag bei ca. 37 µg/ml (71,1 µM). Die Reduktion der relativen Aktivität nach einer fünftägigen Inkubation kann auf eine Hemmung der Proliferation zurückgeführt werden, denn eine quantifizierende Messung der Zellkerne nach Inkubation mit 41 µg/ml ergab eine deutliche Reduktion der Zellkern-Anzahl im Vergleich zur Kontrolle (Dapi-Färbung und Messung bei 360 nm/460 nm). Zusätzlich könnte eine verringerte Zellaktivität vorgelegen haben.

Bezüglich ATA wurde nach 24 h eine Verringerung der relativen Aktivität bei Konzentrationen oberhalb von 14 µg/ml gemessen. Eine Reduktion der relativen Aktivität um 50 % wurde aber auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 370 µg/ml nicht erreicht. Nach fünf Tagen wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von ca. 33 µg/ml bestimmt. Auch hier wurde nach Inkubation mit 41 µg/ml eine deutliche Reduktion der Zellkerne gemessen.

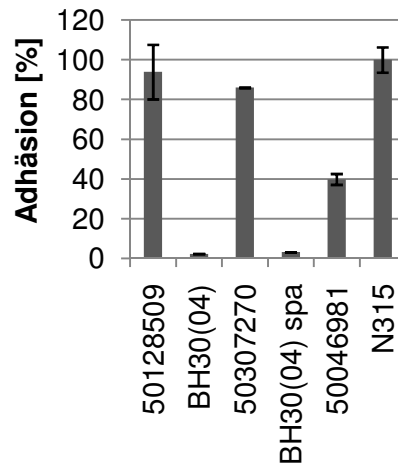
#### **3.1.6.4 Adhäsionseigenschaften verschiedener *S. aureus*-Isolate bzw. Mutanten unter Zugabe der Wirksubstanzen**

Alle Adhäsionsexperimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem MRSA-Stamm *S. aureus* N315 durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Die Wirkung von ATA und PSH auf andere *S. aureus*-Isolate bzw. -Mutanten wurde untersucht, die Ergebnisse sind nachfolgend gezeigt.

Es wurden die IC<sub>10</sub>- und IC<sub>50</sub>-Konzentrationen eingesetzt, die für den Stamm *S. aureus* N315 ermittelt wurden. Dies ermöglichte den direkten Vergleich der Adhäsion der unterschiedlichen Stämme bei gleichen gegebenen Konzentrationen. Es wurden neben dem Referenzstamm *S. aureus* N315 zwei weitere MRSA-Stämme verwendet: 50128509 und BH30(04). Außerdem wurde ein Rifampicin-resistentes *S. aureus*-Isolat (50307270), eine Tetrazyklin-resistente Mutante *S. aureus* (BH30(04) *spa*) und ein MSSA-Isolat (50046981) eingesetzt. Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde bei allen Stämmen jeweils die gleiche OD<sub>600</sub> eingestellt.

Die Stämme zeigten untereinander im direkten Vergleich – ohne Zusatz von Substanz – sehr unterschiedliche Adhäsionsstärken. Die Adhäsion der verschiedenen *S. aureus*-Isolate bzw. Mutanten ohne Substanzzugabe ist in Abbildung 3-20 graphisch dargestellt. Die Adhäsionswerte des Referenzstammes *S. aureus* N315 wurden mit 100 % gleich gesetzt und die Stärken der anderen Stämme auf diese bezogen.

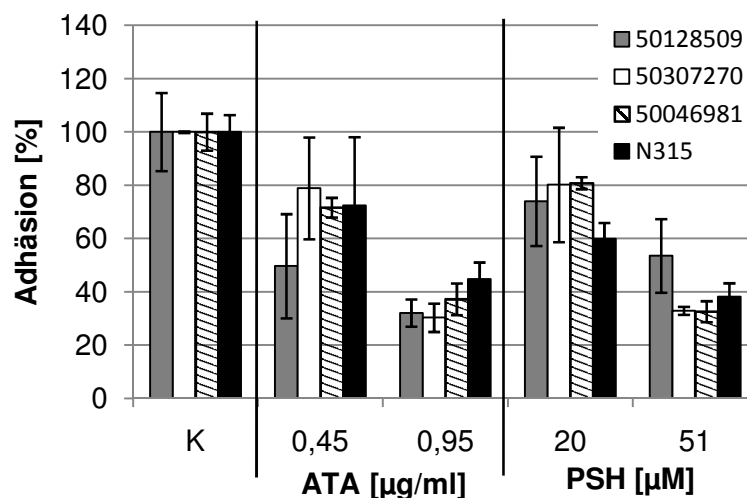
Der Referenzstamm zeigte unter allen Stämmen die stärkste Adhäsion. Der MRSA-Stamm 50128509 sowie das Rifampicin-resistente *S. aureus* Isolat zeigten eine vergleichbare Adhäsionsstärke wie der Referenzstamm. *S. aureus* BH30(04) zeigte hingegen wie die Mutante *S. aureus* BH30(04) *spa* keine gut messbare Adhäsion. Deshalb ist die Aussagekraft für diese beiden Stämme nicht gegeben. Die Adhäsionsstärke des MSSA-Isolats ist im Vergleich zur Adhäsionsstärke des gewählten Referenzstammes um ca. 60 % reduziert.



**Abbildung 3-20: Adhäsion der einzelnen *S. aureus* Stämme ohne Substanz**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils zwei Wells pro Stamm.

Abbildung 3-21 zeigt das Ergebnis des Adhäsionsexperiments unter Zugabe der Wirksubstanzen. Die Adhäsionsstärke der Stämme *S. aureus* BH30(04) sowie der Mutante *S. aureus* BH30(04) *spa* ist aufgrund des insgesamt stark niedrigen Adhäsionslevels in dieser Abbildung nicht dargestellt. Für jeden Stamm wurde die Adhäsionsstärke, die ohne Substanzzugabe erreicht wurde, mit 100 % gleich gesetzt und die Adhäsionsstärken unter Inkubation mit Substanzen darauf bezogen.



**Abbildung 3-21: Adhäsion verschiedener *S. aureus*-Isolate bzw. -Mutanten unter Inkubation mit ATA und PSH**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils zwei Wells pro Substanzkonzentration und pro Stamm. Legende: siehe Graphik. K: Kontrolle

Die vier *S. aureus* Stämme N315, 50128509, 50307270 und 50046981 zeigten alle eine Reduktion der Adhäsion unter Inkubation mit ATA und PSH. Die Aktivitätsstärke unter Einfluss der Substanzen bewegte sich bei den untersuchten Stämmen ungefähr im gleichen Bereich wie beim Referenzstamm. Beim Referenzstamm war die gemessene Adhäsionsreduktion bei diesem Experiment unter Inkubation mit 20 µM und 51 µM PSH größer als im

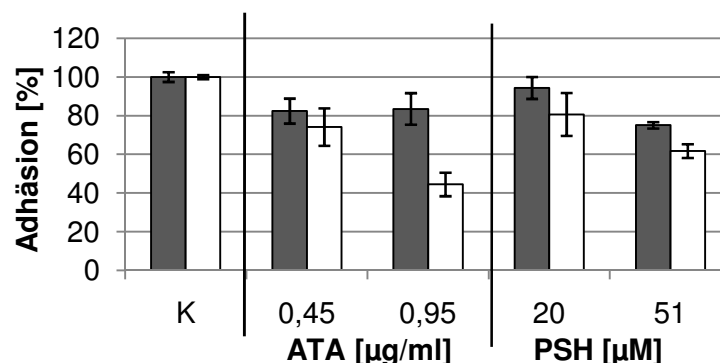
Experiment zur Bestimmung der  $IC_{10}$ - und  $IC_{50}$ -Werte. Durch Zugabe von 51  $\mu$ M PSH wurde die Adhäsion um 60 % reduziert, bei Zugabe von 20  $\mu$ M um 40 %.

Der MRSA-Stamm 50128509 zeigte bei diesem Experiment durch Inkubation mit 0,45  $\mu$ g/ml ATA eine 50 %ige Reduktion der Adhäsion, durch Inkubation mit 0,95  $\mu$ g/ml ATA wurde bei diesem Stamm die Adhäsion ebenfalls stärker reduziert als beim Referenzstamm.

### 3.1.6.5 Einfluss einer Vorinkubationszeit der Wirksubstanzen mit den Epithelzellen auf die Adhäsion von *S. aureus* N315

Als Adhäsionszeit wurde bei dem Assay dieser Arbeit eine Stunde gewählt. Es erfolgte keine Vorinkubation der Epithelzellen mit den Substanzen. In dem im Folgenden vorgestellten Experiment wurde die Fragestellung adressiert, ob eine Vorinkubationszeit der Substanzen mit den A-549-Zellen die Adhäsionsreduktion verstärken kann.

Es wurden jeweils die ermittelten  $IC_{10}$ - und  $IC_{50}$ -Werte für die beiden Substanzen eingesetzt. Die Vorinkubation wurde ü. N. bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt. Die Adhäsionsinkubation wurde anschließend ohne weitere Substanzzugabe direkt mit den behandelten Zellen gestartet. Zum Vergleich wurden in derselben Platte einige Wells so mit Substanz und Bakterien inkubiert, wie laut etabliertem Protokoll vorgegeben. Abbildung 3-22 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.



**Abbildung 3-22: Einfluss einer ü. N. Vorinkubationszeit der Wirksubstanzen mit den Epithelzellen auf die Adhäsion von *S. aureus* N315**

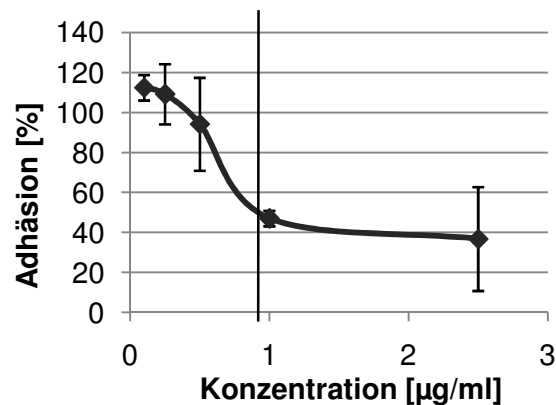
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 4 Wells pro Konzentration einer Substanz. In grau: ü. N. Vorinkubation der A-549 mit Substanzen, weiß: Inkubation der Substanzen für 1 h (zusammen mit den Bakterien)

Ein Einwirken der Substanzen auf die Epithelzellen ü. N. führte zu keiner gesteigerten Adhäsionsreduktion. Im Gegenteil zeigte sich für ATA nach der Vorinkubation eine deutlich verringerte Adhäsionsreduktion. Auch für PSH wurde festgestellt, dass die direkte Zugabe zu den Zellen zu einer stärkeren Adhäsionsreduktion führte als die ü. N. Inkubation. Dieser Unterschied war bei PSH geringfügiger ausgeprägt als bei ATA.

### 3.1.6.6 Überprüfung der Wirkstoffaktivitäten mit nasalen Epithel-Primärzellen

Die adhäsionsinhibierende Wirkung von ATA und PSH wurde unter Anwendung humaner nasaler Epithel-Primärzellen (HNEPC) überprüft. Diese wurden wie die A-549-Zellen in 96-

Well-Platten kultiviert. Die Adhäsion wurde unter Anwendung des etablierten Assays untersucht. Das Ergebnis unter Inkubation mit ATA ist in Abbildung 3-23 gezeigt.

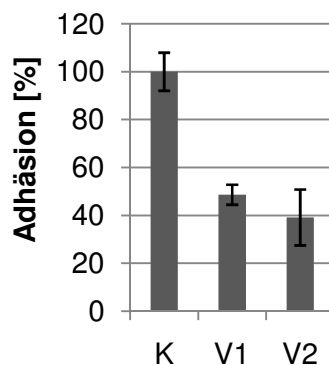


**Abbildung 3-23: Adhäsion von *S. aureus* N315 an HNEPC unter Inkubation mit ATA**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils zwei Wells pro Konzentration. Als senkrechte Linie markiert ist der aus diesem Experiment ermittelte  $IC_{50}$ -Wert.

Die Untersuchungen zeigten, dass ATA die Adhäsion von *S. aureus* N315 an HNEPC ebenfalls effektiv reduziert. Die Wirksamkeit in Abhängigkeit der Konzentration entsprach der, die mit der Zelllinie A-549 ermittelt wurde (vgl. Abbildung 3-16).

Die Aktivität des Pseudohypericins wurde ebenfalls unter Anwendung der HNEPC überprüft. In zwei unabhängigen Experimenten wurde jeweils mit der  $IC_{50}$ -Konzentration (51 µM) inkubiert, die unter Anwendung der A-549-Zellen ermittelt worden war. Bei jedem der zwei Experimente wurde eine Dreifach-Bestimmung erhoben. Abbildung 3-24 zeigt das Ergebnis.



**Abbildung 3-24: Adhäsion von *S. aureus* N315 an HNEPC unter Inkubation mit 51 µM Pseudohypericin (V1 und V2) bzw. mit DMSO (Kontrolle=K)**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten (V1 und V2) mit jeweils drei Wells pro Experiment.

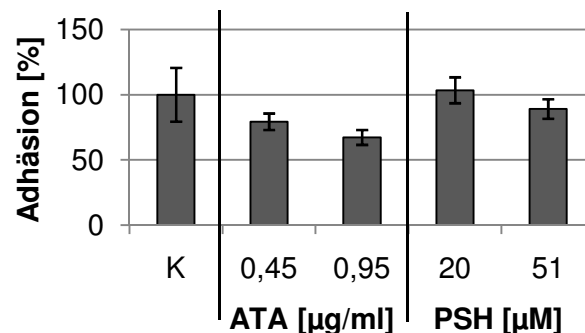
Bei Inkubation mit 51 µM PSH wurde die Adhäsion von *S. aureus* an HNEPC ebenfalls um ca. 50 % reduziert. Somit liegt die adhäsionsreduzierende Aktivität von PSH unter Anwendung der HNEPC im gleichen Konzentrationsbereich wie bei der Zelllinie A-549.

### 3.1.6.7 Wirkung der Substanzen auf die Adhäsion von *S. aureus* SA113 $\Delta srtA$

Der Einfluss von ATA und PSH auf die Sortase-Mutante *S. aureus* SA113  $\Delta srtA$  (Weidenmaier *et al.*, 2008) wurde untersucht.

Extrazelluläre Proteine werden von *S. aureus* hauptsächlich durch Nutzung des Sec-Sekretionsweges sezerniert. Die intrazellulär translatierten Polypeptide, die mittels dieses Sekretionsweges ausgeschleust werden, tragen sowohl eine N-terminale Erkennungssequenz als auch ein C-terminales Zellwand-„Sorting Signal“ mit dem Aminosäure-Motiv LPXTG. Das *S. aureus* Enzym Sortase (SrtA) spaltet an diesem Signalmotiv und katalysiert die kovalente Bindung an Peptidoglykan (Mazmanian *et al.*, 1999; Marraffini *et al.*, 2006). SrtA-Mutanten sind aufgrund der fehlenden Prozessierung und Verknüpfung der Oberflächenproteine stark eingeschränkt in ihren Bindungseigenschaften (Mazmanian *et al.*, 2000). Dieser Phänotyp äußerte sich im Vergleich zum Wildtyp z. B. in einer verminderten Kolonisierung (Schaffer *et al.*, 2006) oder in gelinderten Infektionen (Jonsson *et al.*, 2002) im Mausmodell. Die Viabilität ist *in vitro* uneingeschränkt.

Auch in diesem Experiment wurden die Konzentrationen eingesetzt, die als IC<sub>10</sub>- und IC<sub>50</sub>-Wert für den Stamm *S. aureus* N315 an A-549-Zellen ermittelt wurden. Abbildung 3-25 zeigt die graphische Darstellung des Ergebnisses.



**Abbildung 3-25: Wirkung von ATA und PSH auf die Adhäsion von *S. aureus* SA113  $\Delta$ srtA**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils vier Wells pro Konzentration.

Aufgrund der genetischen Modifizierung adhärierte die Mutante per se stark reduziert. Im Vergleich zum Wildtyp *S. aureus* SA113 lag eine über 70 %ige Adhäsionsreduktion vor, was die Erhebung der Messwerte stark erschwerte.

Die Ergebnisse zeigen eine Adhäsionsreduktion der Sortase-Mutante durch ATA. Die Adhäsion wird mit zunehmender Wirkstoffkonzentration reduziert. Mit diesem Experiment konnte keine Adhäsionsreduktion der Sortase-Mutante durch PSH gezeigt werden.

### 3.1.7 Eigenschaften von Aurintricarbonsäure und weiterführende Tests zur Charakterisierung der Wirkung

#### 3.1.7.1 ATA: eine Substanz mit vielen Strukturen

Bezieht man die Substanz Aurintricarbonsäure kommerziell von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), findet man unter den beiliegenden Angaben die Summenformel C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>O<sub>9</sub> und eine Molmasse von 422,34 g/mol. Allerdings ist angegeben, dass eine erhebliche Menge an polymerer Substanz enthalten sein könnte, und dass das Molekül in wässriger Lösung leicht Polymere bilden kann. In Abhängigkeit vom Herstellungsprozess und den Lagerungs-

bedingungen enthält ATA eine Vielzahl von Neben-, Umlagerungs- und Oligo- bzw. Polymerisierungsprodukten. In mehreren Publikationen wurde dieser Sachverhalt beschrieben und es wurde über Versuche zur Fraktionierung und Charakterisierung der Bestandteile berichtet (González *et al.*, 1979; Cushman *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992). Abbildung 3-26 zeigt eine Auswahl der Strukturen bis zu einem Molekulargewicht von 1000 (Wang *et al.*, 1992). Für einige dieser Strukturen wurde die Isomerbildung nachgewiesen (siehe Abbildung 3-26 Strukturen 4 und 5 sowie Strukturen 8 und 9). Die Strukturen 2 und 7 der Abbildung 3-26 stehen in einem schnellen chemischen Gleichgewicht mit je zwei anderen Isomeren (Struktur 2a-c und 7a-c) (Wang *et al.*, 1992). Diese besondere Form der Isomerbildung wird als Tautomerie bezeichnet.

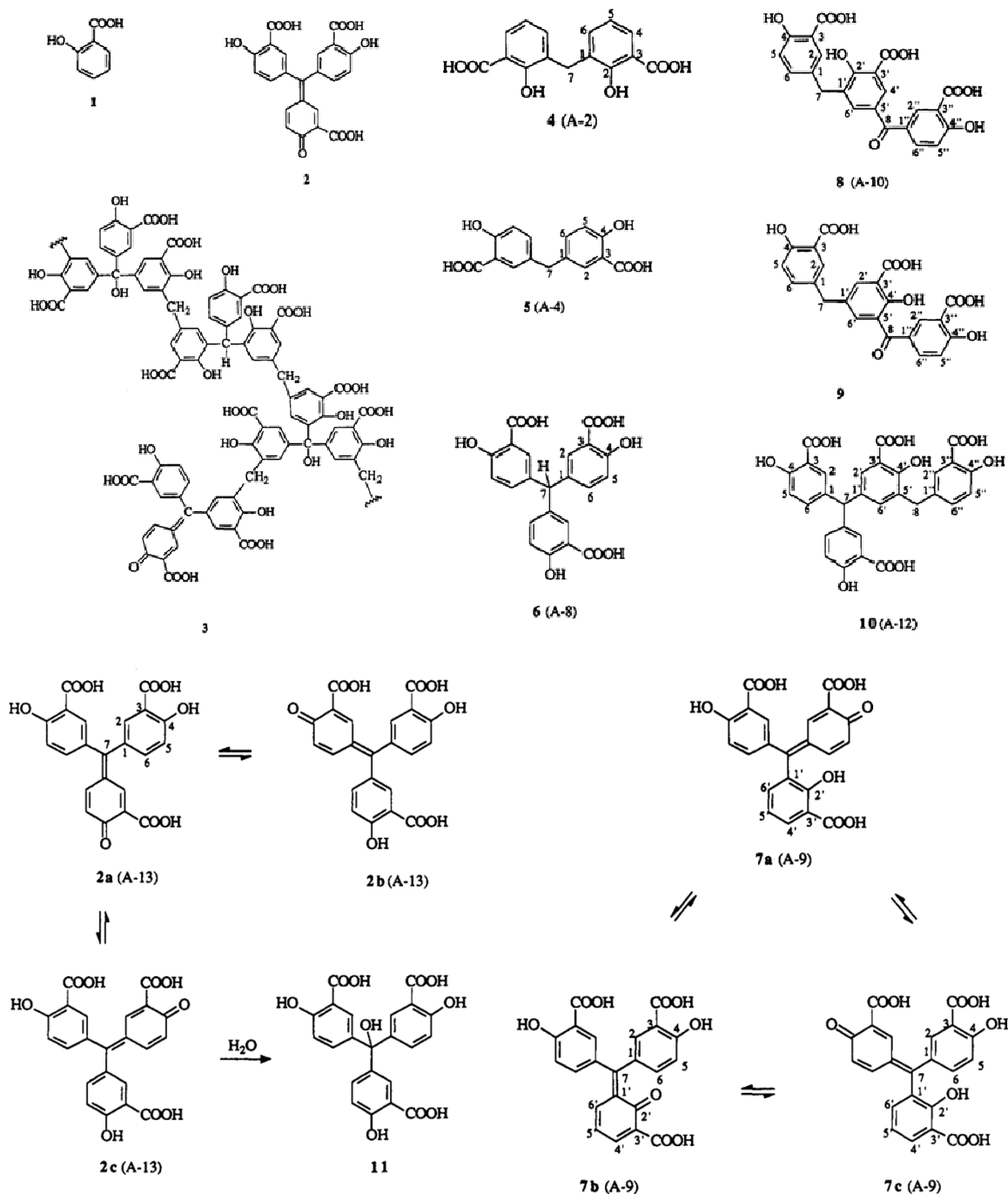
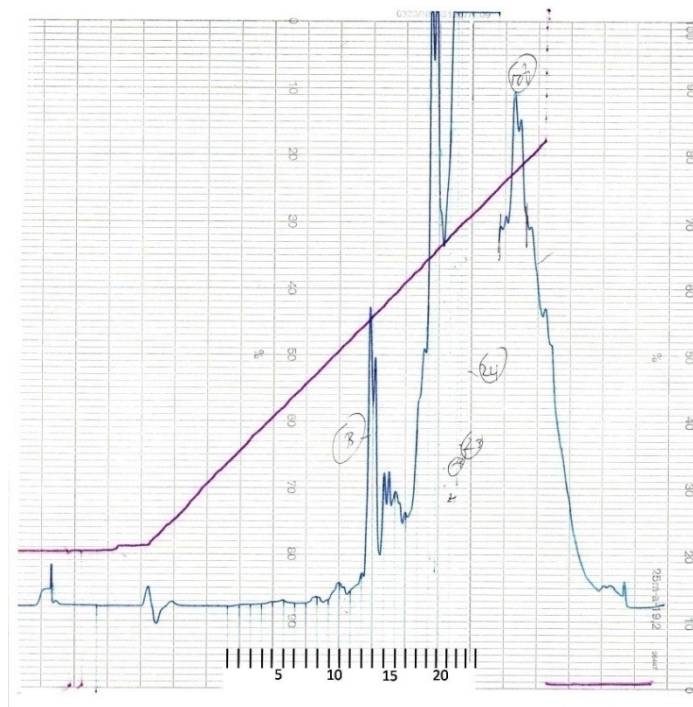


Abbildung 3-26: Einige Strukturen von ATA (Wang *et al.*, 1992)

### 3.1.7.2 Weiterführende Tests zur Charakterisierung der Wirkung von ATA

Fraktionierungen der verschiedenen Bestandteile von ATA sind nicht kommerziell erhältlich. Mittels des im Folgenden vorgestellten Experiments wurde die Fragestellung adressiert, welche der zahlreichen möglichen Strukturen die adhäsionsinhibierende Wirkung erzielt bzw. erzielen. Mit präparativer HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) wurde eine chromatographische Fraktionierung der Substanz bzw. des Substanzgemisches durchgeführt. Abbildung 3-27 zeigt das Chromatogramm des Laufs.



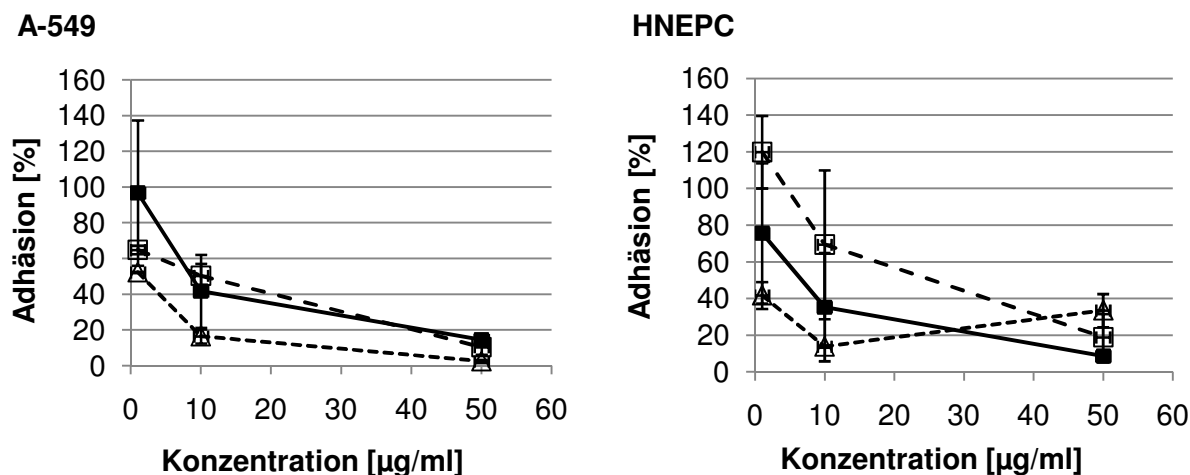
**Abbildung 3-27: HPLC-Lauf von ATA**

Die Leiste im Bild unten zeigt die Markierung der einzelnen Fraktionen.

Die substanzhaltigen Fraktionen (Nr. 13, 19, 20, 22 und 23) wurden anschließend mittels ESI-MS (Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie) analysiert (durchgeführt von der Serviceeinheit Biophysikalische Analytik, HZI). Unter den analysierten Fraktionen befanden sich drei Fraktionen (13, 22 und 23), die als stärkstes Signal 423,08 m/z zeigten, entsprechend Nr. 2 in Abbildung 3-26. Bei den zwei anderen, aufeinanderfolgenden Fraktionen (19 und 20), ließ sich als größter Peak eine Masse von 573,13 messen. Die Fraktionen 19 und 20 und die Fraktionen 22 und 23 wurden jeweils vereint. Eine anschließende analytische HPLC der vereinten und getrockneten Fraktionen ergab relativ scharfe und homogene Peaks für die Fraktion 13 sowie für die Fraktion 19/20. Das Profil für Fraktion 22/23 zeigte nach oben beschriebener Prozedur zwei Peaks.

Die aufgereinigten Fraktionen wurden im Assay in den Konzentrationen 1, 10 und 50 µg/ml auf adhäsionsinhibitorische Eigenschaften getestet. Der Test wurde sowohl mit A-549-Zellen als auch mit HNEPC durchgeführt. Abbildung 3-28 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.





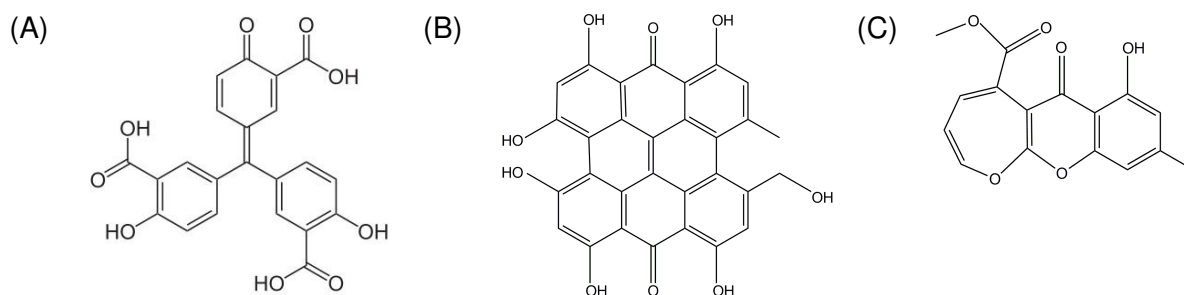
**Abbildung 3-28: Adhäsionsinhibierende Wirkung einzelner ausgewählter, aufgereinigter Fraktionen von ATA auf *S. aureus* N315**

Adhäsionsinhibierende Wirkung einzelner Fraktionen nach Zugabe zu A-549-Zellen (links) bzw. zu HNEPC (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen. Fraktion 13: □, Fraktion 19/20: ■ und Fraktion 22/23: △.

Für alle Fraktionen konnte eine adhäsionsinhibierende Wirkung gezeigt werden. Einige Fraktionen inhibierten die Adhäsion bereits in einer Konzentration von 1 µg/ml. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml zeigten alle Fraktionen eine ca. 90 %ige Adhäsionsreduktion bei den A-549-Zellen. Bei den HNEPC war diese Reduktion etwas schwächer ausgeprägt, jedoch sind die Standardabweichungen unter Anwendung dieser Zellen allgemein höher (siehe auch 3.1.6.6).

### 3.1.8 Versuche zur Identifizierung wirkungsrelevanter Strukturelemente

Es wurde die Fragestellung adressiert, ob – ausgehend von den Strukturen der adhäsionsinhibierenden Substanzen – die für die Wirkung essentiellen Strukturen imitiert bzw. identifiziert und charakterisiert werden können. Die Strukturen der drei Substanzkandidaten dieser Arbeit sind in Abbildung 3-29 gezeigt.



**Abbildung 3-29: Strukturen der drei in dieser Arbeit identifizierten adhäsionsinhibierenden Substanzen**

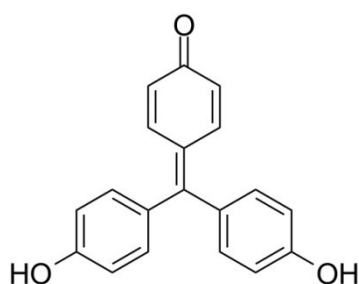
A: Aurintricarbonsäure, B: Pseudohypericin, C: HZI10676D08

Für ATA ist in Abbildung 3-29 die Struktur mit der Molmasse von 422,34 g/mol und der Summenformel  $C_{22}H_{14}O_9$  gezeigt (siehe auch Abbildung 3-26, Nr. 2). ATA entsteht durch Behandlung von Salicylsäure mit Schwefelsäure, Formaldehyd und Natriumnitrit (Caro,



Ein für die chemische Peptidsynthese geeigneter Baustein, der die Struktur von Salicylsäure imitiert, war nicht kommerziell erhältlich, und es existierte auch keine Synthesebeschreibung. Deshalb wurde auf einen Baustein ausgewichen, der die Struktur der Benzoesäure nachstellt. Peptid B trägt diese Bausteine im Wechsel mit den Phenol-imitierenden Bausteinen Phenylalanin (siehe Abbildung 3-31, B). Peptid A unterscheidet sich von Peptid B dadurch, dass anstelle der Benzoesäure-Bausteine Glutaminsäure verwendet wurde.

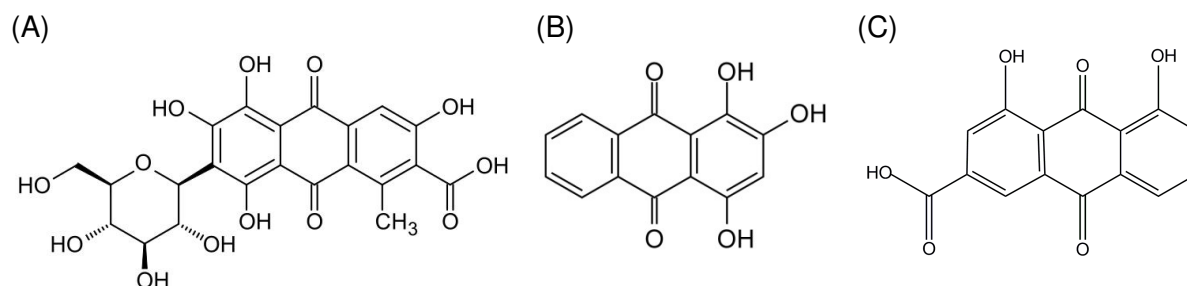
Neben diesen beiden Peptiden wurde der Triphenylmethanfarbstoff Aurin (siehe Abbildung 3-32) auf potentielle adhäsionsinhibierende Wirkung getestet. Aurin bildet sich bei Erhitzen von Phenol mit Oxalsäure in konzentrierter Schwefelsäure.



**Abbildung 3-32: Struktur von Aurin**

Weder die beiden Peptide noch Aurin zeigten adhäsionsinhibitorische Eigenschaften unter Anwendung des Adhäsionsassays. Auch unter der maximal eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurde keine reduzierende Wirkung ermittelt (Daten nicht gezeigt). Ein Test des Aurins auf antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* N315 zeigte nach fünf Stunden Wachstum in BHI eine wachstumsinhibierende Wirkung mit einem MHK-Wert von 12,3  $\mu\text{M}$ .

Darüber hinaus wurden drei kommerziell erhältliche Substanzen getestet, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den identifizierten Substanzkandidaten Pseudohypericin und HZI10676D08 zeigen (siehe Abbildung 3-33). Alle drei Substanzen gehören zu den Hydroxyanthrachinonen und sind Naturstoffe: Karminsäure kann aus Schildläusen gewonnen werden und findet z. B. als Lebensmittelfarbstoff Einsatz; Purpurin kommt natürlicherweise in Krappwurzeln vor und wird vorwiegend zum Färben von Textilien eingesetzt; Rhein ist ein Inhaltsstoff der Rhabarberwurzel, dessen Derivat Diacerein als Arthrose-Therapeutikum zugelassen ist.



**Abbildung 3-33: Substanzen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Pseudohypericin und HZI10676D08**

Gezeigt sind die Strukturen der Hydroxyanthrachinone Karminsäure (A), Purpurin (B) und Rhein (C)

Die drei Verbindungen Karminsäure, Purpurin und Rhein zeigten bei Anwendung im Adhäsionsassay ebenfalls keine Adhäsionsinhibierung von *S. aureus* N315 an A-549-Zellen.

Unter Inkubation mit höheren Konzentrationen (50-100  $\mu\text{M}$ ) des Purpurins war eine Zellablösung der Lungenkarzinomzellen zu beobachten.

## 3.2 Protein-Protein-Interaktionsstudien

In dieser Arbeit wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt, die eine molekulare Charakterisierung des nasalen Adhäsionsprozesses von *S. aureus* adressierten (siehe 1.3). Der strategische Ansatz dieser Experimente baute auf Beobachtungen auf, nach denen die vier *S. aureus* Oberflächenproteine IsdA, ClfB, SdrC und SdrD als essentielle Faktoren im nasalen Adhäsionsprozess fungieren sollen (Corrigan *et al.*, 2009).

In den Experimenten dienten drei Proteine der äußersten Schicht der menschlichen Epidermis als Interaktionspartner für die *S. aureus* Proteine: Cytokeratin 10, Loricrin und Involucrin. Eine Bindung an alle drei humanen Proteine wurde für IsdA nachgewiesen, eine Bindung an Cytokeratin 10 wurde für ClfB gezeigt (O'Brien *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2009). Zur Durchführung der Interaktionsstudien wurden die Peptidsequenzen der drei ausgewählten humanen Proteine auf Cellulosemembranen erzeugt (siehe 2.2.5). Diese Synthese erfolgte unter Anwendung der SPOT-Methode (Frank, 1992). Die vier *S. aureus* Proteine wurden rekombinant hergestellt und mit den SPOT-Membranen inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen die Tags der rekombinanten Proteine.

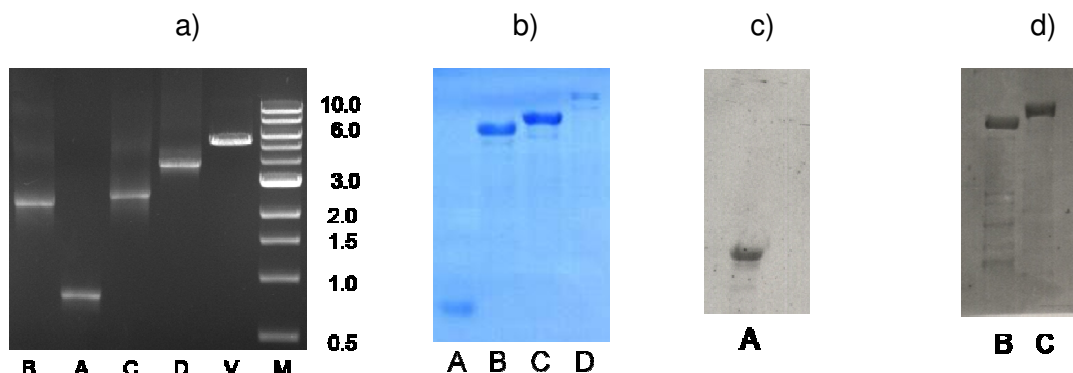
### 3.2.1 Herstellung der Proteine und Peptide

Die vier *S. aureus* Proteine IsdA, ClfB, SdrC und SdrD wurden in dieser Arbeit rekombinant in *E. coli* hergestellt (rIsdA, rClfB, rSdrC, rSdrD). *S. aureus* sezerniert diese vier Oberflächenproteine sowie zahlreiche andere extrazelluläre Proteine mittels des Sec-Sekretionsweges, der sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten ubiquitär vertreten ist. Nach Translation tragen diese Proteine – zur Diskriminierung von im Zytoplasma verbleibenden Proteinen – N-terminal ein 20-30 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches vom „Signal recognition particle (SRP)“ erkannt wird. Mit Hilfe des SRP erfolgt die Orientierung zur Translokationsmaschinerie, die in der Membran lokalisiert ist. Nach Sekretion wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten, und das Protein erlangt extrazellulär seine native Konformation (van Wely *et al.*, 2001; Sibbald *et al.*, 2006; Papanikou *et al.*, 2007). Oberflächenproteine enthalten zur Verknüpfung an die Zelloberfläche ein C-terminales Zellwand-„Sorting Signal“ mit dem Aminosäure-Motiv LPXTG. Das *S. aureus* Enzym Sortase spaltet an diesem Signalmotiv und katalysiert die kovalente Bindung an Peptidoglykan (Mazmanian *et al.*, 1999; Marraffini *et al.*, 2006). Die Proteine wurden in ihrer vollen Länge rekombinant hergestellt; die kodierenden Sequenzen für Signalpeptid und Zellwand-„Sorting Signal“ wurden bei DNA-Amplifizierung unberücksichtigt gelassen.

Als Template zur Amplifizierung der kodierenden Gene wurde genomische DNA des Stammes *S. aureus* N315 verwendet. Dieser Stamm wurde auch in den Screeningexperimenten benutzt. Nach Amplifizierung und Verdau der Sequenzen sowie Verdau des Expressionsvektors (siehe Abbildung 3-34a) wurden die kodierenden Gene jeweils mit dem linearen Expressionsvektor ligiert und in *E. coli* transferiert. Die Klonierungsstrategie wurde so gewählt, dass die exprimierten rekombinanten Proteine sowohl einen T7-Tag (N-terminal) als auch zwei His-Tags (N- und C-terminal) zur späteren Detektion trugen. Nach erfolgreicher Induktion der Proteinexpression in *E. coli*-Klonen, die das gewünschte

Konstrukt trugen, wurden die Proteine mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe Abbildung 3-34b). Die unter Berücksichtigung der Tags und laut Klonierungsstrategie errechnete Größe der rekombinanten Proteine betrug für rlsdA 36 kDa, für rClfB 94 kDa, für rSdrC 102 kDa und für rSdrD 151 kDa.

Die Detektierbarkeit der Proteine über die Tags wurde mittels Anti-His-Antikörpern und der Durchführung von Western Blots bestätigt (siehe Abbildung 3-34c+d). Da die Aufreinigung von rSdrD zu keiner distinkten Bande bei Auftrennung im Polyacrylamidgel führte und zudem die Protein-Ausbeute sehr gering ausfiel, wurde in den nachfolgenden Schritten nur noch mit rlsdA, rClfB und rSdrC gearbeitet.



**Abbildung 3-34: Herstellung der rekombinanten Proteine**

A: rlsdA, B: rClfB, C: rSdrC, D: rSdrD, V: Vektor, M: Marker (Angaben in kb)

a) Elektrophoretische Auftrennung der kodierenden verdauten DNA-Sequenzen der Proteine und des verdauten Vektors. b) Aufgereinigte Proteine rlsdA, rClfB, rSdrC und rSdrD im Polyacrylamidgel, sichtbar gemacht mittels Coomassiefärbung, c) + d) Röntgenfilm zur Visualisierung von rlsdA (c) und rClfB und rSdrC (d) nach Durchführung eines Western Blots mittels Detektion der His-tags.

Die SPOT-Membranen wurden in der Abteilung Chemische Biologie des HZI angefertigt. Als Trägermaterial für die Peptid-SPOTs dienten Cellulosemembranen, auf denen jede Peptidsequenz, bedingt durch das chemische Syntheseverfahren, mit dem C-Terminus verankert war (siehe 2.2.5). Im Anhang sind die Sequenzen der Peptid-SPOTs aufgeführt. Die Peptide wiesen eine Länge von 15 bis 18 Aminosäuren auf. Die Sequenzen wurden mit Überlappungen von 12 Aminosäuren erzeugt, wie in Abbildung 3-35 beispielhaft für die ersten drei SPOTs zur Darstellung des Cytokeratin 10 gezeigt.

SPOT 1 MSVRYSSSKHYSSSR  
 SPOT 2 RYSSSKHYSSSRSGG  
 SPOT 3 SSKHYSSSRSGGGGG

**Abbildung 3-35: Peptide der SPOT-Membran aus der N-terminalen Sequenz von Cytokeratin 10**

Zusätzlich zu den kanonischen Sequenzen der drei humanen Proteine wurden Sequenzvariationen auf den Membranen erzeugt (Quelle für alle humanen Sequenzen und Variationen: „UniProt – Universal Protein Resource“, auf Daten zugegriffen: Juli 2009). Die erzeugten Variationen stellten entweder natürlich vorkommende Variationen dar oder gingen aus „Sequenzkonflikten“ hervor. Sequenzkonflikte entspringen z. B. unterschiedlichen

Sequenzierungsprojekten oder der Sequenzierung biologischer Proben verschiedenen Ursprungs. Sie können entweder Sequenzierungsfehler darstellen oder auf bisher nicht beschriebenen natürlichen Polymorphismen basieren. So wurden bezüglich des Cytokeratin 10 zusätzlich zu 198 Peptiden der kanonischen Sequenz 68 Peptide (34 mit kanonischer Sequenz, 34 mit Variationssequenz) gespottet, bei denen die Sequenzvariation jeweils mittig angeordnet wurde. Beispiel:

Kanonische Sequenz:

Variation:

VRYSSSKHYSSSRSG

VRYSSSKQFSSSRSG

Involucrin wurde in 195 Peptide zerlegt und aufgrund vorkommender Varianten wurden zwölf Peptide zusätzlich erzeugt. 104 Peptide sowie sechs zusätzliche Peptide wurden zur Darstellung des Loricrins auf der SPOT-Membran angeordnet.

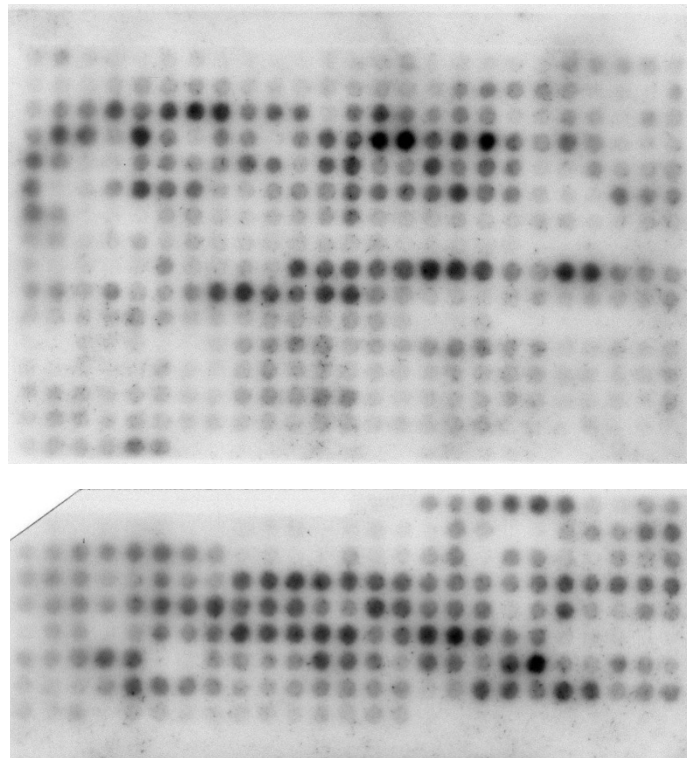
### 3.2.2 Ergebnisse des Protein-Protein-Interaktionsstudien

#### 3.2.2.1 Vortests

Zur Identifizierung möglicher essentieller Bindungsstellen wurden die SPOT-Membranen jeweils einzeln mit den rekombinanten Proteinen über Nacht inkubiert.

In Vortests wurden zunächst die SPOT-Membranen nach einer Blockierungsreaktion (basierend auf Sigma-Aldrich-Blockierungspuffer) ü. N. nur mit den einzusetzenden Antikörpern inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungsstellen zu identifizieren. Es wurden verschiedene AKs getestet. Als primäre Antikörper wurden sowohl ein monoklonaler Anti-T7-AK als auch ein monoklonaler Anti-His-AK getestet. Als sekundäre Antikörper fungierten verschiedene Antikörper, die mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert waren. Auch ein Anti-T7-AK, der direkt mit AP konjugiert war, wurde eingesetzt. Die Detektion der AP erfolgte mit einem Chemilumineszenzsubstrat. Zur Aufnahme der Signale wurden Röntgenfilme unter Lichtabschluss aufgelegt und entwickelt.

Die Durchführung der Bindungsstudien unter alleiniger Inkubation der Membranen mit Antikörpern führte zu Chemilumineszenzsignalen auf den Membranen. Diese Signale traten stets an denselben SPOT-Positionen auf, unabhängig von den verwendeten Antikörpern. In Abbildung 3-36 ist dieses spezifische Muster exemplarisch für eine Versuchsdurchführung mit Anti-His-AK und AP-konjugiertem Antikörper gezeigt. Bei alleiniger Inkubation der Membranen mit einem AP-konjugierten AK (ohne primären AK) wurde dieses Muster ebenfalls beobachtet, allerdings nach etwa 10fach längerer Belichtungszeit des Röntgenfilms als unter Zusatz eines primären Anti-His-Antikörpers.



**Abbildung 3-36: SPOT-Membranen, die mit einem Anti-His- und anschließend mit einem AP-konjugiertem AK inkubiert wurden**

*Die Detektion der Alkalischen Phosphatase erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz unter Einsatz des Immun-Star<sup>TM</sup> AP Substrats versetzt mit Immun-Star<sup>TM</sup> Enhancer von BioRad (München). Zur Aufnahme der gezeigten Signale wurde ein Röntgenfilm unter Lichtabschluss für ca. 3 sek aufgelegt.*

Die Vortests zeigten, dass die eingesetzten Antikörper unspezifisch an viele der Peptidsequenzen banden. Auch der Wechsel des zu detektierenden Epitops (T7- vs. His-Tag) oder der Wechsel des AP-konjugierten Antikörpers (Bezug von anderem Hersteller) brachte keine Verbesserung der unspezifischen Wechselwirkungen. Zudem wurde ein anderes Blockierungsreagenz (basierend auf Genosys-Blockierungspuffer) verwendet, was jedoch ebenfalls keinen Unterschied im Ergebnis erzielte.

### 3.2.2.2 Interaktionsstudien unter Zugabe der rekombinanten Proteine

Nach diesen Vortests wurden die Interaktionsstudien mit den rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Die Aufnahme der Signale nach Inkubation mit den Proteinen brachte gegenüber der alleinigen Inkubation mit den Antikörpern keine zusätzlichen Signale hervor.

Eine Variante der Detektionsmethode wurde getestet, nachdem rClfB über Nacht mit den SPOT-Membranen inkubiert wurde. Bei dieser Variante erfolgte am nächsten Tag keine Detektion direkt auf den SPOT-Membranen, sondern die SPOT-Membranen wurden für einen elektrophoretischen Transfer des potentiell gebundenen Proteins auf eine Nitrocellulosemembran eingesetzt. Die anschließende Detektion des potentiell gebundenen und transferierten Proteins auf Nitrocellulose erfolgte wie unter 2.2.4.11 für die Methode des Western Blots beschrieben. Es wurde ein sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper eingesetzt und die



Detektion erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines Chemilumineszenzsubstrats. Es konnte kein Signal auf der Nitrocellulosemembran detektiert werden.

Somit konnten mit diesem experimentellen Ansatz keine spezifischen humanen Sequenzen identifiziert werden, die für die Bindung der eingesetzten *S. aureus* Oberflächenproteine essentiell sind.

In einigen unter 3.2.3 vorgestellten Experimenten wurde der möglichen Ursache für das Ergebnis dieser Studien nachgegangen. Hier werden verschiedene Experimente zur Überprüfung der rekombinanten Proteine vorgestellt.

### 3.2.3 Überprüfung der rekombinanten Proteine

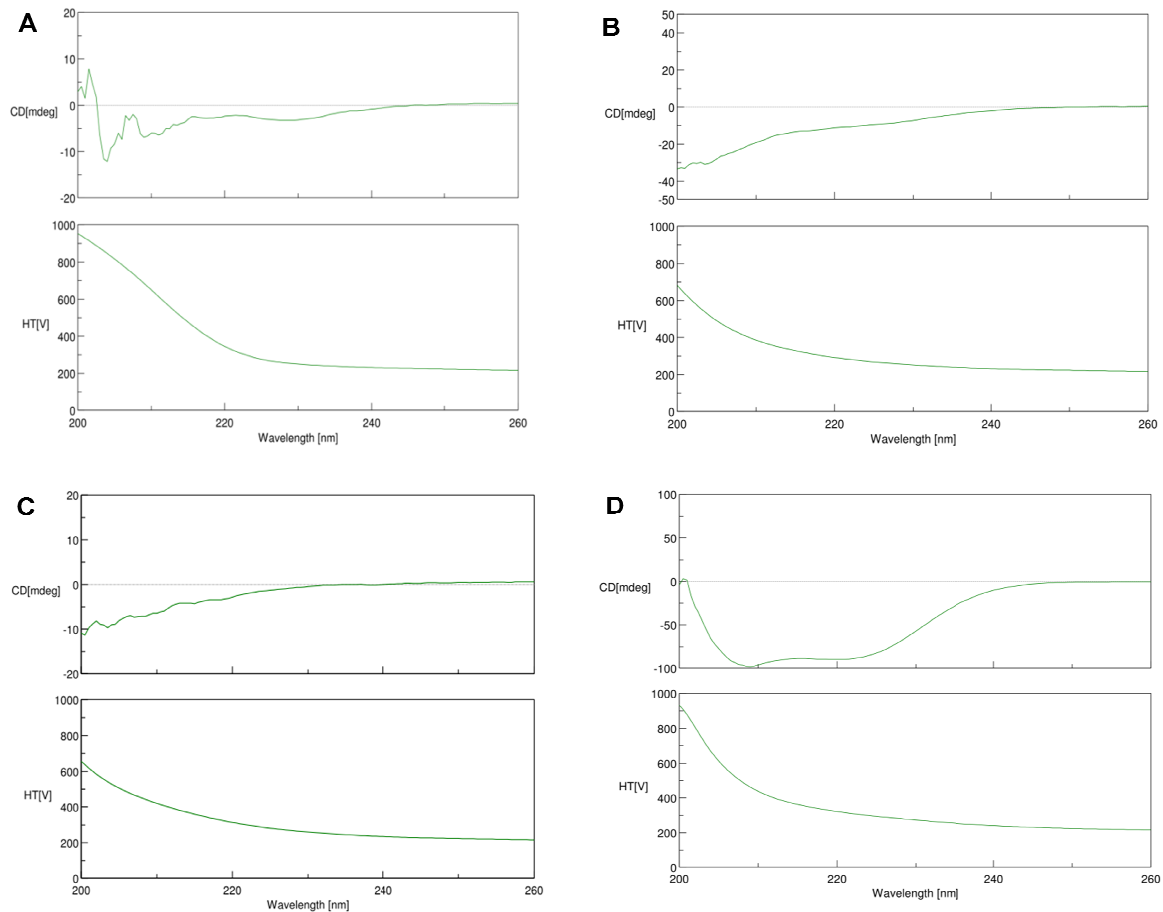
Zunächst wurden Protein-Sequenz-Analysen der ersten 20 bis 30 N-terminalen Aminosäuren durchgeführt (Edman-Abbau, durchgeführt von Rita Getzlaff, Serviceeinheit Biophysikalische Analytik des HZI). Die Ergebnisse dieser Ansequenzierungen ergaben in allen Fällen die aufgrund der Klonierungsstrategie erwarteten Sequenzen, sodass die Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit wie erwartet synthetisiert wurden.

Nach tryptischem Verdau der Proteine wurden außerdem MALDI-TOF-Massenspektrometrien durchgeführt (siehe 2.2.5.2). Durch Abgleich der erhaltenen Fragmentmuster mit den für zahlreiche Proteine hinterlegten Spektren in der Datenbank wurde für jedes Protein *in silico* mit der höchsten Wahrscheinlichkeit das erwartete Protein ermittelt.

Zur Überprüfung der Faltung der rekombinanten Proteine wurde mit jedem der drei Proteine, und zusätzlich zum Vergleich mit kommerziell bezogenem BSA, eine CD-Spektroskopie durchgeführt (Jasco J-815 CD Spektrometer in der Abteilung Makromolekulare Interaktionen, HZI, siehe Abbildung 3-37). Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie lassen vermuten, dass rClfB und rSdrC keine Sekundärstruktur aufweisen. Der Kurvenverlauf deutete auf „Random Coil“ hin. Der Kurvenverlauf der CD-Spektroskopie des rlsdA hingegen ist mit dem Vorliegen einer Sekundärstruktur vereinbar.

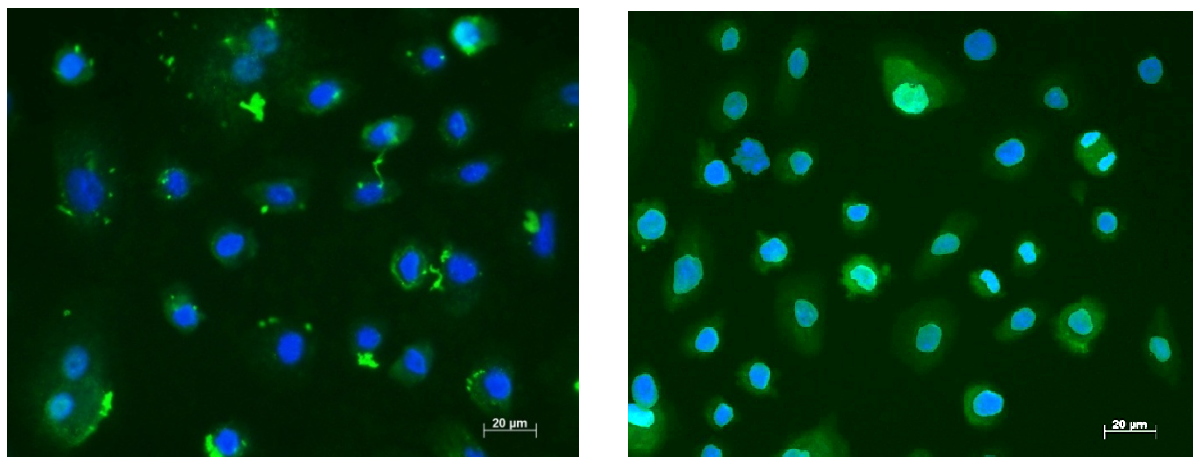
Außerdem wurde die Bindung der rekombinanten Proteine an humane nasale Primärzellen überprüft. Für dieses Experiment wurden die rekombinanten Proteine ü. N. mit humanen nasalen Primärzellen inkubiert. Zur Detektion der gebundenen Proteine wurde ein muriner Anti-His-AK mit anschließender Inkubation mit einem grün-fluoreszierenden Anti-Maus AK eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit Dapi gefärbt.

Die mit rlsdA inkubierten Zellen zeigten im Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm eine deutliche Emission (siehe Abbildung 3-38, links). Nach Inkubation der Primärzellen mit rClfB und rSdrC konnte keine Bindung festgestellt werden.



**Abbildung 3-37: CD-Spektroskopie der rekombinanten Proteine**

Dargestellt ist das aufgenommene Spektrum im Bereich von 260-200 nm von A: *rlsdA*, B: *rClfB*, C: *rSdrC*, D: BSA



**Abbildung 3-38: A-549-Zellen inkubiert mit *rlsdA* (links) und ohne rekombinantes Protein (rechts)**

Diese Ergebnisse bestätigen den Hinweis aus der CD-spektroskopischen Messung, dass *rlsdA* in einer gefalteten und funktionalen Konformation vorliegt. Für die Proteine *rClfB* und *rSdrC* ergibt sich aus den fehlenden Hinweisen für eine Sekundärstruktur aus den CD-Messungen und den negativen Bindungsversuchen die Vermutung, dass keine funktionale Struktur vorliegt.

### 3.3 Transkriptomanalysen

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung des Adhäsionsassays war die Wahl des Mediums, das für die Adhäsionsperiode verwendet werden sollte. Dieses sollte sowohl die Epithelzellen als auch die Bakterien während der Inkubation mit Nährstoffen versorgen. Zudem musste die Vorkultivierungsdauer bzw. die Wachstumsphase von *S. aureus* festgelegt werden.

Die bakterielle Expression von Adhäsionsfaktoren ist sowohl abhängig vom Kultivierungsmedium als auch von der Wachstumsphase (van Wamel *et al.*, 1998; Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000; Luong *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2007; Nicholson *et al.*, 2009). Deshalb war ein wichtiges Kriterium die Verwendung eines Mediums, in dem *S. aureus* möglichst viele Adhäsionsfaktoren exprimiert. In diesem Medium sollte *S. aureus* möglichst zu einem optimalen Kultivierungszeitpunkt für die Adhäsionsexperimente verwendet werden.

Zur Ermittlung dieses bestmöglichen Mediums sowie der am besten geeigneten Kultivierungsdauer wurden in dieser Arbeit Transkriptomanalysen durchgeführt. Die Expressionsdaten wurden sowohl unter Betrachtung des Gesamt-Transkriptoms als auch unter separater Betrachtung einer Teilmenge von Genen, die Adhäsionsfaktoren kodieren, analysiert. Die Analysen dienten so zusätzlich der generellen näheren Charakterisierung der Medien- sowie Wachstumsphasen-abhängigen Genexpression. Solche Studien lagen bisher noch nicht vor.

#### 3.3.1 Darstellung der Versuchsbedingungen

Für die Kultivierung der Bakterien wurden drei verschiedene Vollmedien gewählt, die in den meisten publizierten Untersuchungen mit *S. aureus* verwendet worden sind: LB, BM und BHI. Außerdem wurde ein artifizielles nasales Medium (ANM) eingesetzt, das in seiner Zusammensetzung das Nährstoffangebot und die Bedingungen in den Nasenvorhöfen imitiert. In Vorversuchen wurden Wachstumskurven unter Kultivierung von *S. aureus* N315 in diesen Medien erstellt, um die Zeitpunkte der Wachstumsphasen zu ermitteln (ohne Abbildung). Die Erhebung der Transkriptom-Daten wurde zu drei verschiedenen Wachstumsphasen durchgeführt: exponentiell, post-exponentiell und früh-stationär. Tabelle 3-7 zeigt eine Auflistung über die Versuchsbedingungen, zu denen Transkriptomanalysen erhoben wurden. Die RNA-Isolierungen und GeneChip®-Hybridisierungen wurden in vier Intervallen mit jeweils zeitlichen Abständen durchgeführt, hier wiedergegeben durch die Bezeichnungen Block I - Block IV.

**Tabelle 3-7: Gewählte Versuchsbedingungen zur Transkriptom-Analyse**

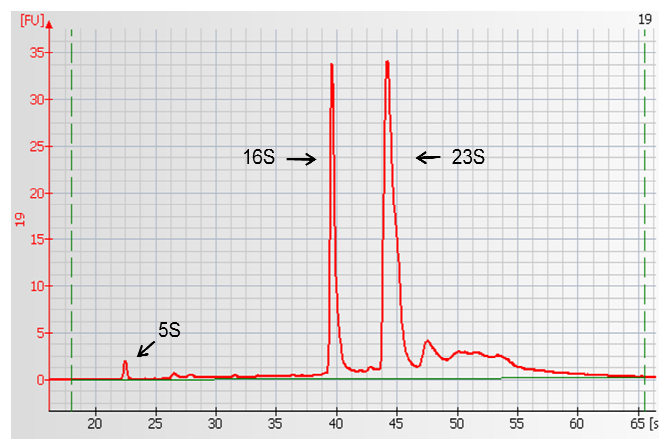
	<b>Name der Proben</b>	<b>Wachstumsphase</b>
Block I	LB 8 h	früh-stationär
	BM 8 h	früh-stationär
	BM ü. N. + Infektionsmedium*	stationär + exponentiell*
Block II	BHI 2 h	exponentiell
	BHI 4 h	post-exponentiell
	BHI 8 h	früh-stationär

	<b>Name der Proben</b>	<b>Wachstumsphase</b>
Block II	BHI 2 h + Infektionsmedium*	exponentiell + exponentiell*
Block III	ANM 5 h	exponentiell
	ANM 8 h	post-exponentiell
Block IV	BHI ü.N. + Infektionsmedium*	stationär + exponentiell*

\* (mögliche) experimentelle Bedingung im Adhäsionsassay: ü. N. bzw. 2 h Wachstum in BM bzw. BHI, 2 x Waschen in PBS, Überführen in Infektionsmedium, Inkubation für 1,5 h bei RT, RNA-Ernte

### 3.3.2 Qualität der Transkriptomanalysen

Bevor die isolierte RNA zu Microarray-Analysen aufbereitet wurde, wurde sie einer Qualitätskontrolle unterzogen (siehe 2.2.6.3). Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der RNA mit dem Bioanalyzer-2100 (Agilent) wurden im Gel drei distinkte Banden sichtbar, die der ribosomalen RNA (der 23S, 16S und 5S rRNA) zuzuordnen sind. Ein basierend auf dieser Auftrennung erzeugtes Elektropherogramm ist in Abbildung 3-39 für eine RNA-Aufreinigung dieser Arbeit beispielhaft gezeigt.



**Abbildung 3-39: Elektropherogramm zur Qualitätsanalyse aufgereinigter RNA, erstellt nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung mit dem Agilent Bioanalyzer-2100**

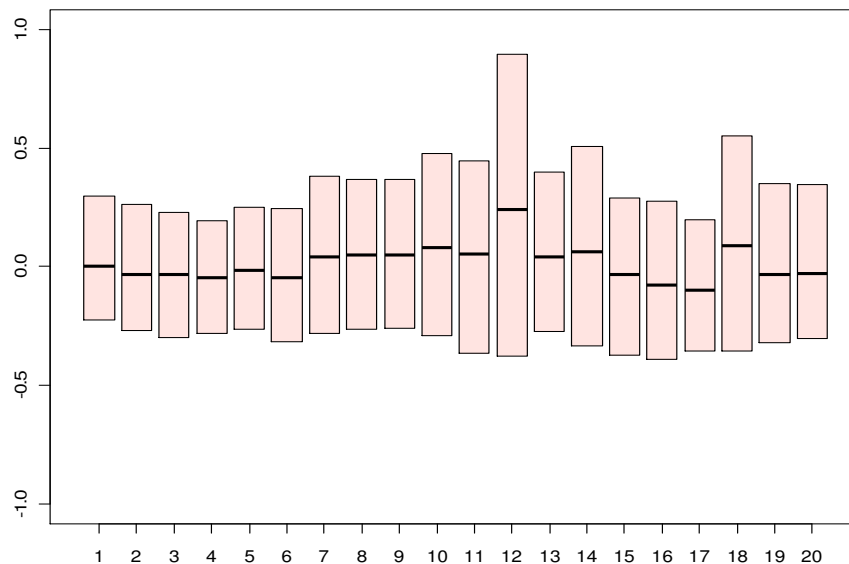
Das in Abbildung 3-39 dargestellte Elektropherogramm ließ auf qualitativ hochwertige RNA schließen. Von der Gerätesoftware wurde außerdem eine „RNA Integrity Number“ (RIN) ausgegeben (Agilent, 2004). Dieser Algorithmus lässt die Qualität anhand fester Werte beurteilen (Skala von 1 bis 10). Dabei spiegelt der niedrigste Wert von 1 das Höchstmaß an degradierter RNA wider, eine RIN von 10 repräsentiert das Maximum an intakter RNA. Alle RIN-Werte, die bei der Qualitätskontrolle der in dieser Arbeit eingesetzten RNA erhoben wurden, lagen im obersten Bereich.

Die gewonnenen Transkriptomdaten wurden mittels verschiedener bioinformatischer Verfahren analysiert, durchgeführt von Dr. Raimo Franke, HZI (siehe 2.2.6.5).

Die eingesetzten 20 Affymetrix GeneChips® sind in diesem Kapitel mit den Nummern 1 bis 20 bezeichnet. Im Folgenden sind einige Abbildungen zur Visualisierung der Datenqualität als Boxplots gezeigt. Boxplots dienen der graphischen Darstellung der Verteilung statistischer Daten. Innerhalb einer jeweiligen Box liegen die mittleren 50 % der Daten, die

waagerechte Linie innerhalb einer Box stellt den Median der Werte dar. Die Ausdehnung der Box wird als Interquartilsabstand bezeichnet und dient als Maß für die Streuung der Daten. Die Länge der gestrichelten Linien (Whisker) beträgt maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstandes ( $1,5 \times \text{IQR}$ ), und die Linien enden bei dem Wert aus der Datenmenge, der noch innerhalb dieser Grenze liegt.

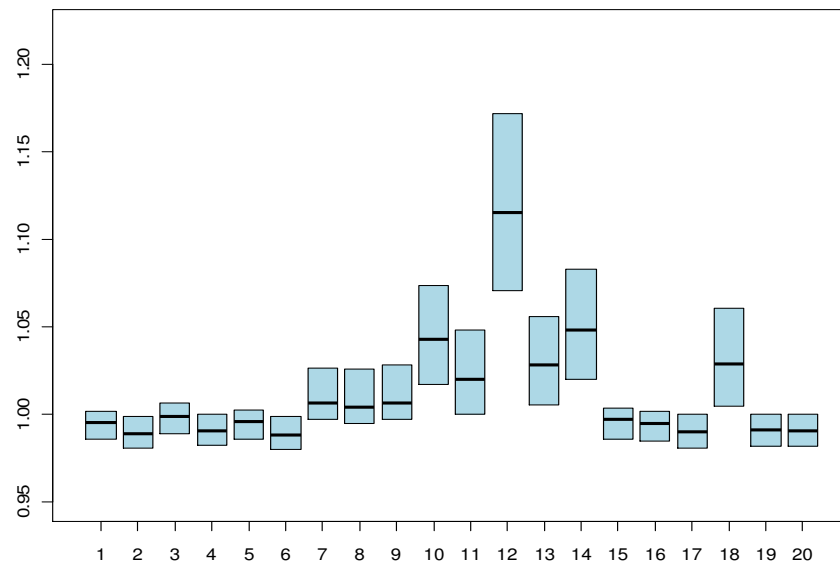
In Abbildung 3-40 ist die relative logarithmische Expression (RLE) für jeden GeneChip® mittels Boxplots dargestellt.



**Abbildung 3-40: RLE-Plots (relative logarithmische Expression)**

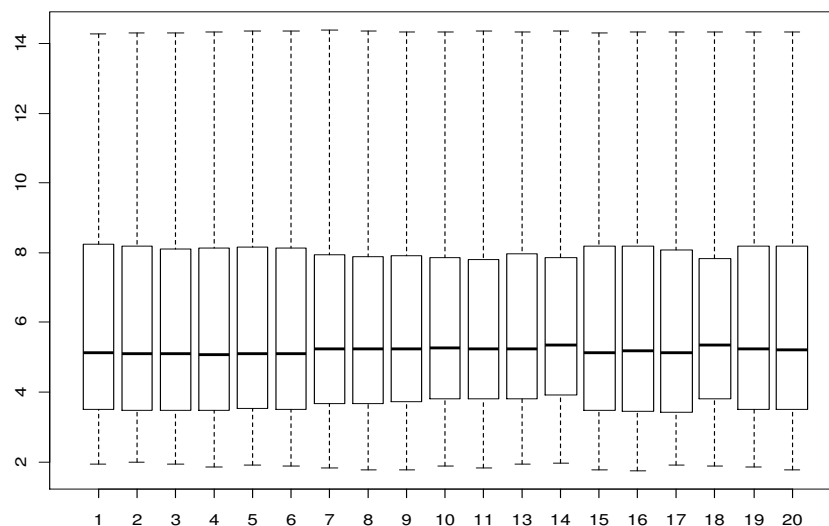
Die Werte der RLE werden berechnet, indem der Expressionswert jedes einzelnen *Probe Sets* (siehe 2.2.6) jeweils durch den Median der Expressionswerte dieses *Probe Sets*, erhoben über alle Arrays (Pseudo-Median), dividiert wird. Folgt man der Grundannahme, dass die Expression der meisten Gene sich über alle betrachteten Arrays nicht verändert, sollten die RLE-Werte nahe 0 liegen. Arrays mit schlechterer Qualität fallen im RLE-Plot dadurch auf, dass der Median weiter entfernt von 0 ist und/oder der IQR (und damit die Ausdehnung der Box) größer als der der anderen Arrays ist. Dies trifft besonders auf Array 12 zu.

Eine weitere Möglichkeit, die Qualität der Arrays zu beurteilen, ist in Abbildung 3-41 gezeigt.



**Abbildung 3-41: NUSE-Plots (*Normalized Unscaled Standard Error*)**

Diese Abbildung 3-41 zeigt eine Darstellung der normalisierten unskalierten Standardfehler (NUSE – *Normalized Unscaled Standard Error*). Hierfür wird für den Standardfehler eines jeden *Probe Sets* ein Schätzwert mittels eines *Probe Set Modells* (*fitPLM*, *fit a Probe Level Model*, (Bolstad et al., 2005)) berechnet. Dieser geschätzte Fehler wird dann über die Arrays standardisiert, sodass über alle Arrays der Median-Standardfehler 1 sein sollte. Ein höherer Median-Standardfehler zeigt typischerweise einen Array von schlechter Qualität an, was hier erneut für Array 12 deutlich zutrifft. Deshalb wurde dieser Array bei der weiteren Analyse und Interpretation der Daten nicht berücksichtigt (siehe Abbildung 3-42 und Folgende). Eventuell traten bei der Aufarbeitung dieser RNA-Probe Fehler im Markierungsprozess auf, sodass die gesamte Signalintensität bei diesem Chip geringer ausfiel.



**Abbildung 3-42: log2 Expressionswerte nach RMA (*Robust Multi-array Averaging*)**

Abbildung 3-42 zeigt das Ergebnis der Normalisierung mittels RMA (*Robust Multi-Array Averaging*) (Bolstad et al., 2003). RMA führt zunächst eine *Probe*-spezifische Korrektur der *PM-Probes* (siehe 2.2.6) durch (Modellierung der Intensitäten als Summe von Signal und Hintergrund). Die korrigierten *PM-Probes* werden mittels Quantilen-Normalisierung

normalisiert und die Berechnung der Expressionswerte erfolgt mittels Median-Polish. Abbildung 3-42 zeigt die Boxplots der log2 Expressionswerte nach RMA-Normalisierung für die 19 Arrays. Median und IQR sind für die 19 Arrays nahe beieinander, was die Voraussetzung für die weitere Analyse der Daten ist.

### 3.3.3 Ergebnisse der Transkriptomanalysen

Nach Qualitätskontrolle und Normalisierung der Rohdaten erfolgte eine weitergehende Analyse, um eine biologische Interpretation der gewonnenen Daten zu ermöglichen. Dazu wurden hierarchische Clusteranalysen sowie Anreicherungsanalysen von Dr. Raimo Franke, HZI, durchgeführt.

Jedes Gen ist mit mehreren verschiedenen GO-terms annotiert. GO steht für *Gene Ontology* und dient als kontrolliertes Vokabular zur einheitlichen, Spezies-übergreifenden Annotation einzelner Gene. Da die *Gene Ontology* keinen expliziten GO-term *Adhesion* als biologischen Prozess aufführt, wurde anhand von Literaturdaten ein eigenes Datenset erstellt und 50 *Probe Sets* ausgewählt, die mit Adhäsionsprozessen assoziiert sind. Im Folgenden werden diese separat betrachteten Gene als „Adhäsionsgene“ bezeichnet (Auflistung siehe Tabelle 3-8). Da drei dieser Gene mit jeweils zwei *Probe Sets* auf den GeneChips® dargestellt wurden, stellen die 50 *Probe Sets* 47 Adhäsionsgene dar.

**Tabelle 3-8: Adhäsionsgene, die bei Dateninterpretation gesondert fokussiert wurden**

<b>Name des Gens</b>	<b>Synonyme des Gens</b>	<b>Bezeichnung des Proteins (alternative Bezeichnungen)</b>	<b>Swiss-Prot-Nr.</b>	<b>Referenzen</b>
<i>atl</i>	<i>nag</i>	Bifunctional autolysin (includes: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, Mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase)	Q99V41	(Foster, 1995; Oshida <i>et al.</i> , 1995; Biswas <i>et al.</i> , 2006)
<i>capA</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5A	Q7A842	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O’Riordan and Lee, 2004)
<i>capB</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5B	Q99X66	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O’Riordan and Lee, 2004)
<i>capC</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C	Q7A841	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O’Riordan and Lee, 2004)
<i>capD</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5D	Q7A840	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O’Riordan and Lee, 2004)
<i>capE</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E	Q7A839	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O’Riordan and Lee, 2004)
<i>capF</i>		Capsular polysaccharide synthesis	Q7A838	(Pöhlmann-Dietze <i>et</i>

<b>Name des Gens</b>	<b>Syn- onyme des Gens</b>	<b>Bezeichnung des Proteins (alternative Bezeichnungen)</b>	<b>Swiss- Prot-Nr.</b>	<b>Referenzen</b>
		enzyme Cap5F		<i>al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capG</i>		UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (EC 5.1.3.14)	Q7A837	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capH</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme O-acetyl transferase Cap5H	Q7A836	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capI</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5I	Q7A835	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capJ</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5J	Q7A834	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capK</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5K	Q7A833	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capL</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5L	Q7A832	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capM</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5M	Q7A831	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capN</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5N	Q7A830	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capO</i>		Capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O	Q7A829	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>capP</i>		UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	Q7A828	(Pöhlmann-Dietze <i>et al.</i> , 2000; O'Riordan and Lee, 2004)
<i>clfA</i>		Clumping factor A (Fibrinogen-binding protein A, Fibrinogen receptor A)	Q99VJ4	(Mempel <i>et al.</i> , 1998)
<i>clfB</i>		Clumping factor B (Fibrinogen-binding protein B, Fibrinogen receptor B)	Q7A382	(O'Brien <i>et al.</i> , 2002; Schaffer <i>et al.</i> , 2006; Corrigan <i>et al.</i> , 2009)
<i>coa</i>		Staphylocoagulase	Q7A7X2	(Mempel <i>et al.</i> , 1998)
<i>ebhA</i>		Extracellular matrix-binding protein ebhA (ECM-binding protein homolog A)	Q99U54	(Clarke <i>et al.</i> , 2002)
<i>ebhB</i>		Extracellular matrix-binding protein ebhB (ECM-binding protein	Q7A5M1	(Clarke <i>et al.</i> , 2002)



<b>Name des Gens</b>	<b>Syn- onyme des Gens</b>	<b>Bezeichnung des Proteins (alternative Bezeichnungen)</b>	<b>Swiss- Prot-Nr.</b>	<b>Referenzen</b>
		homolog B)		
<i>ebps</i>		Elastin-binding protein ebpS	Q7A5I6	(Downer et al., 2002)
<i>emp</i>	<i>empbp ssp</i>	Extracellular matrix protein-binding protein emp	Q7A6P4	(Hussain et al., 2001)
<i>eno</i>		Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase, 2-phospho-D- glycerate hydro-lyase)	P99088	(Carneiro et al., 2004)
<i>fib</i>	<i>efb</i>	Fibrinogen-binding protein	P68800	(Mamo et al., 1994; Palma et al., 1996)
<i>fnbA</i>		Fibronectin-binding protein A	Q7A3J7	(Mempel et al., 1998)
<i>fnbB</i>		FnbB Protein	Q7A3J8	(Mempel et al., 1998)
<i>icaA</i>		Poly-beta-1,6-N-acetyl-D- glucosamine synthase (Biofilm polysaccharide intercellular adhesin synthesis protein IcaA)	Q7A351	(Cramton et al., 1999)
<i>icaB</i>		Poly-beta-1,6-N-acetyl-D- glucosamine N-deacetylase (Biofilm polysaccharide intercellular adhesin deacetylase)	Q7A349	(Cramton et al., 1999)
<i>icaC</i>		Probable poly-beta-1,6-N-acetyl-D- glucosamine export protein (Biofilm polysaccharide intercellular adhesin export protein)	Q7A348	(Cramton et al., 1999)
<i>icaD</i>		Poly-beta-1,6-N-acetyl-D- glucosamine synthesis protein IcaD (Biofilm polysaccharide intercellular adhesin synthesis protein IcaD)	Q7A350	(Cramton et al., 1999)
<i>isdA</i>	<i>frpA stbA</i>	Iron-regulated surface determinant protein A (Staphylococcal transferrin-binding protein A, Fur- regulated protein A)	Q7A655	(Clarke et al., 2004; Clarke et al., 2009; Corrigan et al., 2009)
<i>isdB</i>	<i>frpB sasJ sirH</i>	Iron-regulated surface determinant protein B (Staphylococcal iron- regulated protein H, Fur-regulated protein B, Staphylococcus aureus surface protein J)	Q7A656	(Mazmanian et al., 2003)
<i>isdC</i>	<i>sirD</i>	Iron-regulated surface determinant protein C (Staphylococcal iron- regulated protein D)	Q7A654	(Mazmanian et al., 2003)
<i>isdE</i>	<i>sirF</i>	High-affinity heme uptake system protein isdE (Iron-regulated surface determinant protein E, Staphylococcal iron-regulated protein F)	Q7A652	(Mazmanian et al., 2003)

<b>Name des Gens</b>	<b>Syno- nyme des Gens</b>	<b>Bezeichnung des Proteins (alternative Bezeichnungen)</b>	<b>Swiss- Prot-Nr.</b>	<b>Referenzen</b>
<i>isdF</i>	<i>sirG</i>	Probable heme-iron transport system permease protein isdF (Iron-regulated surface determinant protein F, Staphylococcal iron-regulated protein G)	Q7A651	(Mazmanian <i>et al.</i> , 2003)
<i>isdH</i>	<i>harA</i> <i>sasI</i>	Iron-regulated surface determinant protein H (Haptoglobin receptor A, Staphylococcus aureus surface protein I)	Q99TD3	(Dryla <i>et al.</i> , 2003)
<i>isdI</i>		Heme-degrading monooxygenase isdI (Iron-regulated surface determinant isdI, Iron-responsive surface determinant isdI, Heme oxygenase)	Q7A827	(Skaar <i>et al.</i> , 2004)
<i>map</i>	<i>eap</i>	Protein Map (extracellular adherence protein)	P69775	(Hussain <i>et al.</i> , 2002; Kreikemeyer <i>et al.</i> , 2002)
<i>pls</i>		Surface protein (Plasmin-sensitive surface protein)	P80544	(Huesca <i>et al.</i> , 2002; Roche <i>et al.</i> , 2003)
<i>sdrC</i>		Serine-aspartate repeat-containing protein C	Q7A781	(Josefsson <i>et al.</i> , 1998; Corrigan <i>et al.</i> , 2009)
<i>sdrD</i>		Serine-aspartate repeat-containing protein D	Q7A780	(Josefsson <i>et al.</i> , 1998; Corrigan <i>et al.</i> , 2009)
<i>sdrE</i>		Serine-aspartate repeat-containing protein E	Q99W46	(Josefsson <i>et al.</i> , 1998; O'Brien <i>et al.</i> , 2002)
<i>sle1</i>	<i>aaa</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sle1	Q7A7E0	(Heilmann <i>et al.</i> , 2005)
<i>spa</i>		Immunoglobulin G-binding protein A (IgG-binding protein A, Staphylococcal protein A)	P99134	(Mempel <i>et al.</i> , 1998)
<i>sraP</i>	<i>sasA</i>	Serine-rich adhesin for platelets (Staphylococcus aureus surface protein A)	Q7A362	(Hartleib <i>et al.</i> , 2000; Siboo <i>et al.</i> , 2005)

### 3.3.3.1 Hierarchische Clusteranalysen

Clusteranalysen ermöglichen es, Gruppen von ähnlichen Objekten von anderen unähnlichen Objekten zu separieren. Bei der hierarchischen Clusteranalyse von Genexpressionsdaten werden Gene von ähnlicher Expressionsstärke gruppiert (in einem Cluster dargestellt) und von Genen mit abweichender Expressionsstärke separiert (in einem anderen Cluster dargestellt). Je ähnlicher die Genexpressionsstärke, desto näher sind die entsprechenden Partitionen der Gene in dem Dendrogramm angeordnet. Eine naheliegende biologische

Interpretation dieser Dendrogramme ist, dass Gene, die zusammen gruppiert werden, ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegen.

Neben den Clusteranalysen der Gene wurden auch die Kultivierungsbedingungen einer Clusteranalyse unterzogen. Dies galt zum einen der Überprüfung, ob die biologischen Replikate zusammen clustern und zum anderen der Analyse, welche Bedingungen sich am stärksten ähneln bzw. sich am stärksten unterscheiden bezüglich des Einflusses auf das Transkriptom.

Die hierarchische Clusteranalyse in Abbildung 3-43 zeigt zusätzlich zum Dendrogramm eine *Heatmap* für den Vergleich der Expressionsstärken. Die Expressionswerte sind in dieser Darstellung in die Z-Skala transformiert, d.h. dargestellt ist der Expressionswert von Gen X abzüglich des Mittelwertes von Gen X (berechnet über alle Bedingungen) dividiert durch die Standardabweichung von Gen X (ebenfalls berechnet über alle Bedingungen). Die rote Markierung in der *Heatmap* repräsentiert in Relation zum Mittelwert eine verringerte Expression des entsprechenden Gens, eine grüne Markierung eine verstärkte Expression. Je intensiver die Färbung, desto schwächer bzw. stärker ist die relative Genexpression und je stärker der Farbunterschied, desto stärker ist der relative Unterschied.

Abbildung 3-43 zeigt eine *Heatmap* für die 47 Adhäsionsgene, bei der sowohl die Gene als auch die 19 Proben (Arrays) einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen wurden (nur unter Berücksichtigung der 47 Adhäsionsgene). Zusätzlich wurden Clusteranalysen unter Betrachtung aller *Probe Sets* durchgeführt (siehe Abbildung 3-44).

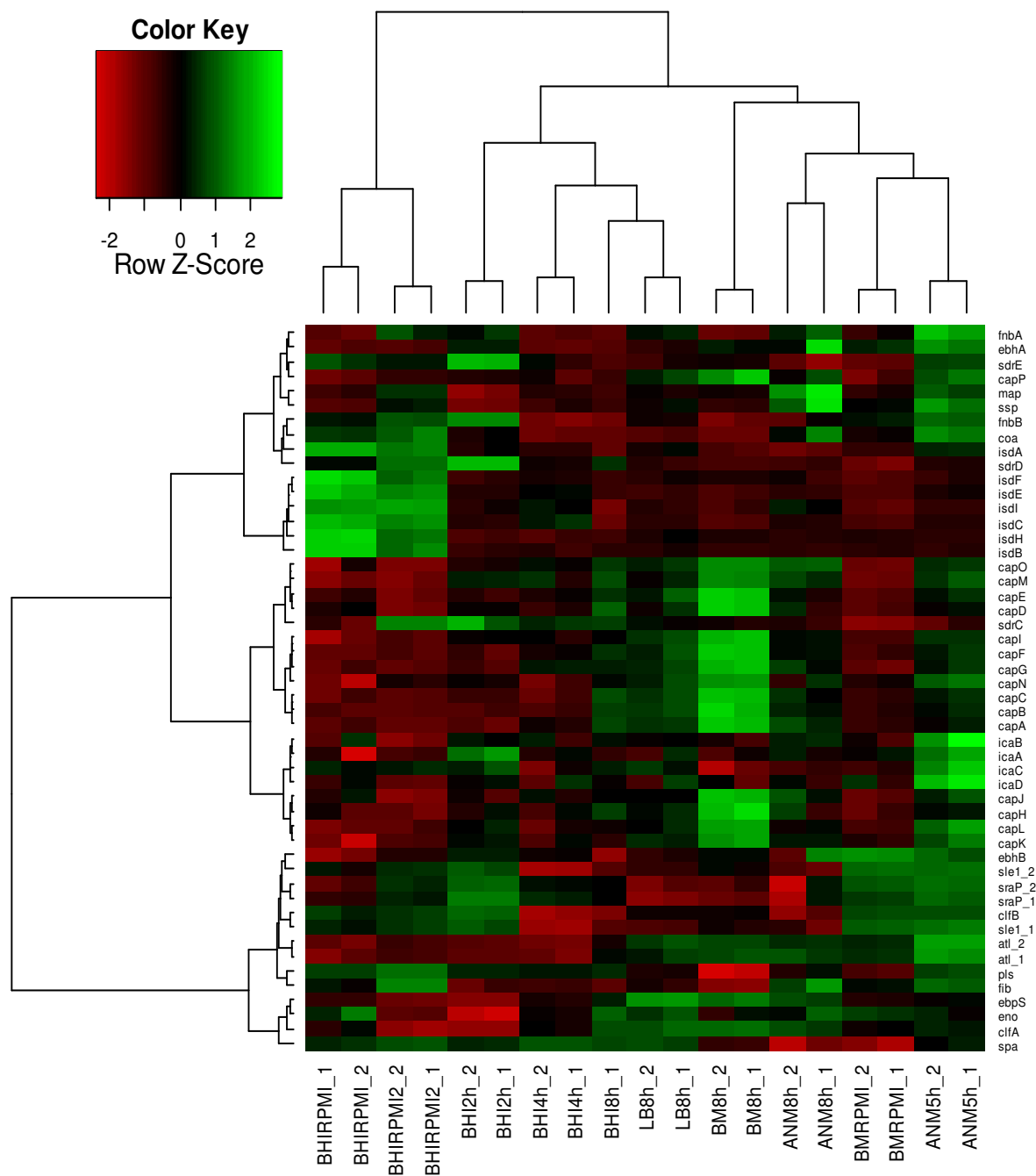
Die hierarchische Clusteranalyse der Adhäsionsgene zeigt eine Gruppierung zahlreicher Gene mit gleichem Buchstabencode (siehe Abbildung 3-43). So werden insbesondere die *cap*-Gene, die *ica*-Gene sowie die *isd*-Gene zusammen gruppiert. Außerdem clustern die Replikate einer Versuchsbedingung zusammen, wie es bei einer validen und reproduzierbaren Datenerhebung zu erwarten ist. Dies trifft sowohl auf diese Clusteranalysen zu, die auf Basis der Adhäsionsgene erstellt wurden (siehe Abbildung 3-43), als auch auf die, die basierend auf allen *Probe Sets* erzeugt wurden (siehe Abbildung 3-44). Bei Vergleich der Replikate zeigt Abbildung 3-43 zudem für die einzelnen Gene meist einen gleichen bzw. ähnlichen Farbton. All diese Beobachtungen heben die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Analysen hervor.

Zudem clustern ähnliche Versuchsbedingungen oftmals zusammen. So werden z. B. alle Analysen, die das Transkriptom in der früh-stationären Phase darstellen, zusammen gruppiert (siehe Abbildung 3-43 sowie Abbildung 3-44).

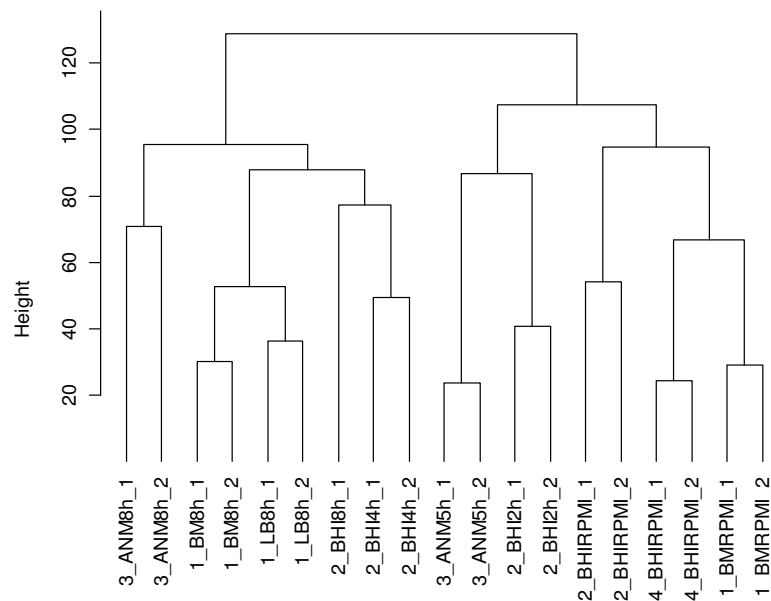
Abbildung 3-43 zeigt, dass unter allen untersuchten Bedingungen die *cap*-Gene in BM in der früh-stationären Phase am stärksten exprimiert vorliegen. Die *isd*-Gene werden nach Wachstum in BHI und Umpufferung in Infektionsmedium im Vergleich am stärksten exprimiert. Die Gruppe der *ica*-Gene liegt in ANM in der exponentiellen Phase am stärksten hochreguliert vor.

Das Genexpressionsprofil der Adhäsionsgene (Abbildung 3-43) zeigt, dass in ANM im Vergleich zu den anderen Bedingungen die meisten dieser Gene hochreguliert vorliegen.

Unter Vergleich beider untersuchten Wachstumsphasen in ANM sind die meisten Adhäsionsgene in der exponentiellen Phase hochreguliert.



**Abbildung 3-43: Hierarchische Clusteranalyse der 47 ausgewählten Adhäsionsgene sowie der zehn Bedingungen.**



**Abbildung 3-44: Hierarchische Clusteranalyse der zehn Versuchsbedingungen, basierend auf allen *Probe Sets* der GeneChips®**

### 3.3.3.2 Differentiell-exprimierte Gene und Anreicherungsanalysen

Neben den Clusteranalysen wurden Anreicherungsanalysen (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*) durchgeführt (Subramanian *et al.*, 2005).

Unter Verwendung von GO-terms wird jedes Gen auf verschiedenen Hierarchieebenen bzw. mittels verschiedener Ober- und sich weiter differenzierender Subkategorien beschrieben. Die Anreicherungsanalysen dieser Arbeit wurden basierend auf der Gen-Ontologie für biologische Prozesse der 3. Hierarchieebene durchgeführt. Diese Ebene stellt entsprechend dem Anwendungsziel einen guten Kompromiss zwischen zu viel Detail und zu wenig Spezifität dar. Ein Gen kann auf nur einer GO-Hierarchieebene mit mehreren GO-terms annotiert sein. Zum Beispiel ist das Gen *hlgC* von *S. aureus* N315, das für das Protein „*Gamma-hemolysin component C*“ kodiert, auf Ebene 3 sowohl mit dem GO-term „*Interaction with host*“ wie auch mit „*Killing of cells in other organism during symbiotic interaction*“ sowie mit weiteren GO-terms annotiert.

Mit der GSEA kann ermittelt werden, welche GO-terms innerhalb einer vorselektierten Gruppe von Genen (z. B. die Gene, die differentiell exprimiert sind beim Vergleich zweier Bedingungen) statistisch signifikant angereichert (überrepräsentiert) sind. So kann beispielsweise darauf geschlossen werden, welche Stoffwechselwege im Vergleich vermehrt vom Organismus genutzt oder welche Oberflächenproteine verstärkt synthetisiert werden.

Im Fokus dieser Arbeit lag die Inhibierung der Adhäsion von *S. aureus* an Epithelzellen der Nasenvorhöfe. Da die Genexpression im artifiziellen nasalen Medium ANM folglich für diese Arbeit von besonderem Interesse war, wurden die resultierenden Daten aus diesem Medium mit denen aus dem Vollmedium BHI verglichen. So ergaben sich zwei Vergleiche: ANM5h vs. BHI2h (exponentielle Wachstumsphase) und ANM8h vs. BHI4h (post-exponentielle Wachstumsphase).

Die Unterschiede in der Expression der Adhäsionsgene werden im Folgenden anhand des Parameters *Fold Change* quantitativ angegeben. Diesen Wert erhält man durch Division des Expressionswertes bei einer Bedingung durch den Expressionswert der Vergleichsbedingung. In dieser Arbeit wird der Logarithmus des *Fold Change* zur Basis 2 (*logFC*) angegeben.

### 3.3.3.2.1 Vergleich ANM5h vs. BHI2h – exponentielle Wachstumsphase

Nach 5 h Wachstum in ANM war *S. aureus* N315 in der exponentiellen Wachstumsphase, ebenso wie nach 2 h Wachstum in BHI. Der Vergleich dieser beiden Bedingungen zeigt, dass in ANM5h im Vergleich zu BHI2h 577 Gene (604 *Probe Sets*) hochreguliert vorlagen. Unter diesen Genen waren 17 Adhäsionsgene (18 *Probe Sets*) hochreguliert (Abbildung 3-45, links).

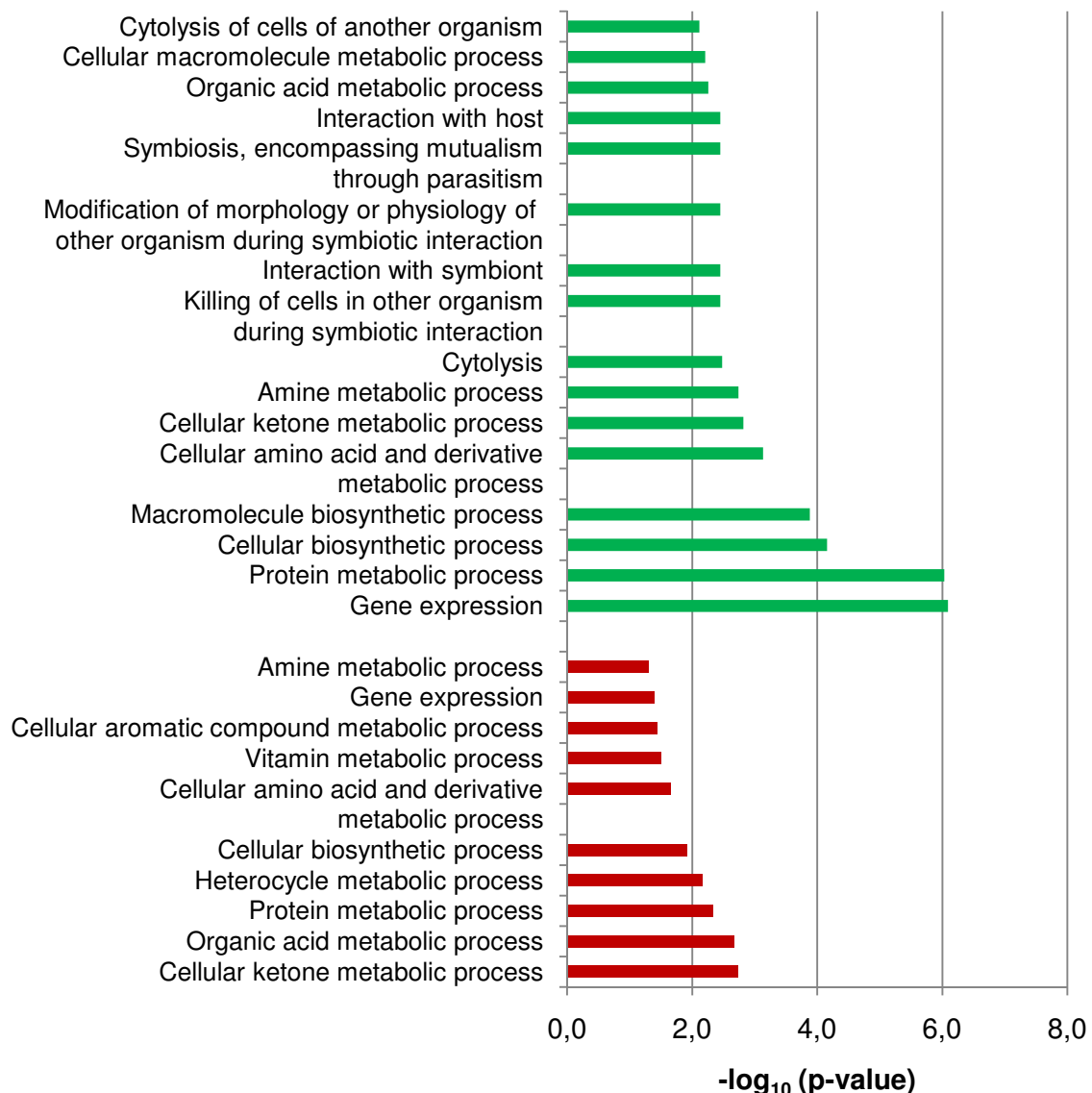
303 Gene (317 *Probe Sets*) waren in ANM5h im Vergleich zu BHI2h runterreguliert. Unter diesen befinden sich die 3 Adhäsionsgene *sdrC*, *sdrD* und *sdrE* (Abbildung 3-45, rechts).

Gen	logFC		
ssp	4,76		
map	3,44		
clfA	3,09		
coa	2,79		
fib	2,75		
atl_1	2,54		
atl_2	2,45		
fnb	1,65		
capA	1,58		
capB	1,36		
capC	1,27		
isdA	1,26		
ebpS	1,09		
capG	1,00		
capE	0,75	Gen	logFC
capO	0,72	sdrE	-0,68
capP	0,67	sdrC	-1,84
isdH	0,58	sdrD	-3,36

**Abbildung 3-45: In ANM5h im Vergleich zu BHI2h hoch- bzw. runterregulierte Adhäsionsgene**

Die hoch- bzw. runterregulierten Gene sind nach *logFC* geordnet. Die *logFC*-Werte der hochregulierten Gene sind grün (Liste links), die der runterregulierten Gene rot markiert (Liste rechts).

Abbildung 3-46 zeigt die Ergebnisse der Anreicherungsanalysen. Je kleiner der p-Wert, desto signifikanter die Anreicherung. In Abbildung 3-46 sind die  $-\log_{10}$ -Werte graphisch dargestellt und nach p-Werten geordnet, folglich nimmt die Signifikanz von oben nach unten zu.



**Abbildung 3-46: Ergebnisse der Anreicherungs-Analysen ANM5h vs. BHI2h**

Dargestellt sind die angereicherten GO-terms, geordnet nach p-Werten. In grün markiert (obere Balken) sind die  $-\log_{10}$ -Werte der angereicherten GO-terms, die für die in ANM5h hochregulierten Genen statistisch überrepräsentiert sind, in rot markiert (untere Balken) sind die  $-\log_{10}$ -Werte der entsprechenden GO-terms, die für die in ANM5h runterregulierten Gene angereichert werden konnten.

In ANM5h vs. BHI2h liegen 17 GO-terms signifikant angereichert vor, die die Funktion der hochregulierten Gene beschreiben. Es liegen hier viele GO-terms vor, die Virulenzprozesse beschreiben, z. B. „Killing of cells in other organism during symbiotic interaction“, „Interaction with host“ oder „Modification of morphology or physiology of other organism during symbiotic interaction“. Die zehn verbleibenden GO-terms beschreiben hauptsächlich Gene, die mit verschiedenen metabolischen Prozessen annotiert sind wie z. B. mit Aminosäure-Metabolismen oder dem zellulären Keton-Metabolismus.

Bezüglich der in ANM5h runterregulierten Gene liegen drei GO-terms statistisch signifikant angereichert vor. Neben dem GO-term „Gene expression“ liegen zwei GO-terms vor, die Gene annotieren, die für Transmembran-Proteine kodieren. Diese sind in Transmembran-

Transportprozesse involviert (GO-term „*Transmembrane transport*“, z. B. *sirA*, kodiert für *Iron-regulated ABC transporter siderophore-binding protein SirA*) bzw. in zytolytische Prozesse von *S. aureus* (GO-term „*Programmed cell death*“).

### 3.3.3.2.2 Vergleich ANM8h vs. BHI4h – post-exponentielle Wachstumsphase

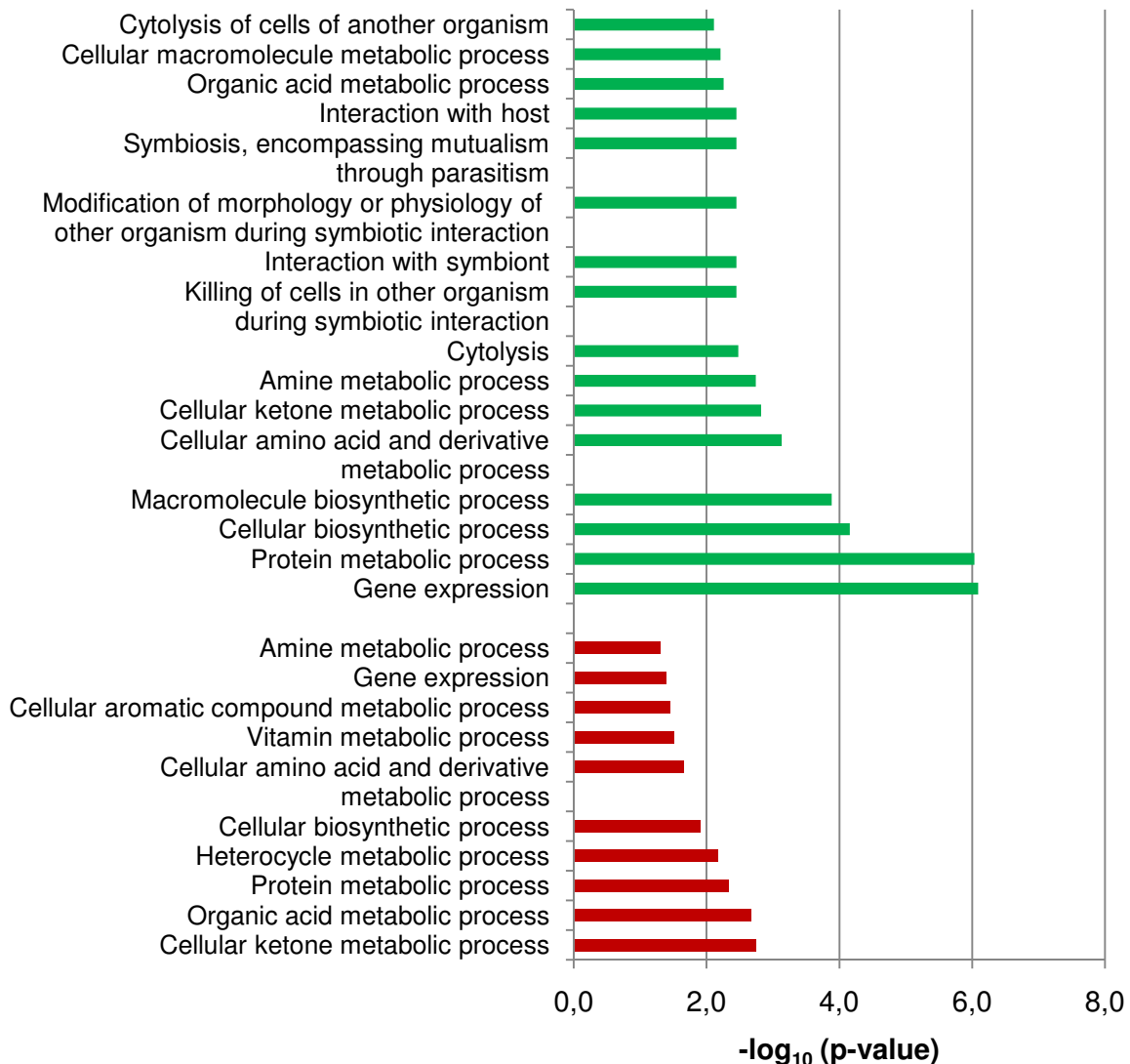
Nach 8 h Wachstum in ANM war *S. aureus* N315 in der post-exponentiellen Wachstumsphase, ebenso wie nach 4 h Wachstum in BHI. In ANM8h sind im Vergleich zu BHI4h 474 Gene (508 *Probe Sets*) hochreguliert. Darunter befinden sich 16 Adhäsionsgene (18 *Probe Sets*, siehe Abbildung 3-47, links). 450 genes (474 *Probe Sets*) sind in ANM8h im Vergleich zu BHI4h runterreguliert. Unter diesen sich 8 Adhäsionsgene zu finden (siehe Abbildung 3-47, rechts).

Gen	logFC	Gen	logFC
ssp	3,80	sdrE	-0,57
map	3,72	sdrD	-0,62
coa	3,44	sdrC	-0,82
fib	2,58	isdE	-0,95
ebhA	2,47	isdA	-1,30
atl_1	1,98	sraP_1	-1,38
fnb	1,76	spa	-1,52
capC	1,58	isdC	-1,54
atl_2	1,53		
clfA	1,37		
sle1_2	1,30		
fnbB	1,29		
capB	1,29		
capA	1,28		
sle1_1	1,14		
ebpS	0,80		
capO	0,73		
isdH	0,69		

**Abbildung 3-47: In ANM8h im Vergleich zu BHI4h hoch- bzw. runterregulierte Adhäsionsgene**

Die hoch- bzw. runterregulierten Gene sind nach logFC geordnet. Die logFC-Werte der hochregulierten Gene sind grün (Liste links), die der runterregulierten Gene rot markiert (Liste rechts).





**Abbildung 3-48: Ergebnisse der Anreicherungs-Analysen ANM8h vs. BHI4h**

Dargestellt sind die angereicherten GO-terms, geordnet nach  $p$ -Werten. In grün markiert (obere Balken) sind die  $-\log_{10}$ -Werte der angereicherten GO-terms, die für die in ANM8h hochregulierten Genen statistisch überrepräsentiert sind, in rot markiert (untere Balken) sind die  $-\log_{10}$ -Werte der entsprechenden GO-terms, die für die in ANM8h runterregulierten Gene angereichert werden konnten.

Abbildung 3-48 zeigt die angereicherten GO-terms des Vergleichs ANM8h vs. BHI4h. Wie bei dem Vergleich ANM5h vs. BHI2h sind bzgl. der hochregulierten Gene in ANM8h vs. BHI4h viele Virulenz-assoziierte GO-terms angereichert. Unter den 16 GO-terms, die für die hochregulierten Gene angereichert werden konnten, sind hier sieben GO-terms Virulenzprozessen zuzuordnen, weitestgehend entsprechend dem Vergleich ANM5h vs. BHI2h.

Sieben GO-terms, hauptsächlich mit metabolischen Prozessen verknüpft, sind sowohl unter den hoch- als auch unter den runterregulierten Genen signifikant angereichert. Zu diesen gehören die GO-terms „Cellular biosynthetic process“, „Gene expression“, „Amine metabolic process“, „Cellular ketone metabolic process“, „Organic acid metabolic process“, „Protein metabolic process“ und „Cellular amino acid and derivative metabolic process“. Für die in ANM8h hochregulierten Gene konnten nur zwei GO-terms angereichert werden, die weder mit Virulenz assoziiert noch bei den runterregulierten Genen ebenfalls zu finden sind. Es sind

die GO-terms „*Macromolecule biosynthetic process*“ und „*Cellular macromolecule metabolic process*“. Virulenzgene können aber auch mit GO-terms annotiert sein, die namentlich nicht unmittelbar die Virulenzrelevanz benennen. Mit dem GO-term „*Cellular macromolecule metabolic process*“ wie auch mit „*Macromolecule biosynthetic process*“ ist beispielsweise das Gen *vraR* annotiert, welches für das *Response regulator protein vraR* kodiert. Die Expression dieses Gens ist funktional mit der Vermittlung von  $\beta$ -Lactam- und Glycopeptid-Antibiotikaresistenzen verknüpft (Kuroda *et al.*, 2003).

## 4 Diskussion

### 4.1 Adhäsionsassay

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Inhibitoren der Schleimhaut-besiedlung durch *Staphylococcus aureus*. Der Adhäsionsassay, der in diesem Rahmen entwickelt und etabliert wurde, erwies sich als aussagekräftige Methode, mit der Adhäsions-inhibitoren identifiziert wurden. Im Folgenden werden einzelne Aspekte des entwickelten Verfahrens sowie damit gewonnene Ergebnisse diskutiert.

#### 4.1.1 Entwicklung des Verfahrens

Eine grundsätzliche Richtlinie bei der gesamten Entwicklung des Assays war eine experimentell möglichst starke Annäherung an die *in vivo* Situation.

Das Screening fand unter statischen Bedingungen statt. In der Nase sind die Bakterien allerdings durch Bewegung der Zilien und einem Fluss des Nasensekrets (Mukus) stärkerem Stress ausgesetzt als unter diesen statischen Bedingungen *in vitro* imitiert. Auch spielt die Zusammensetzung des Mukus eine wichtige Rolle im Adhäsionsprozess, insbesondere aufgrund der Eigenschaften der strukturgebenden Mucine. In einigen Studien wurden für Mucine eine adhäsionsinhibierende Wirkung nachgewiesen (Smith *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2000; Solzbacher *et al.*, 2003), auf der anderen Seite sind jedoch auch adhäsionsfördernde Wirkungen bekannt (Ascencio *et al.*, 1998; Lillehoj *et al.*, 2001; Aristoteli *et al.*, 2003). Unter Simulierung der natürlichen Situation in der Nase sind die Adhäsionseigenschaften des Stammes *S. aureus* SA113 im Gegensatz zur Untersuchung unter statischen Bedingungen verändert (Weidenmaier *et al.*, 2008). Die reduzierten Adhäsionseigenschaften der Mutanten *S. aureus* SA113  $\Delta tagO$  und *S. aureus* SA113  $\Delta srtA$  wurden hier bei Imitierung eines Nasensekret-Flusses und einer Cilienbewegung stärker reduziert als unter statischen Bedingungen (Weidenmaier *et al.*, 2008). Bei Untersuchungen zur bakteriellen Adhäsion muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen der Komplexität des *in vivo* Geschehens und der Notwendigkeit der Simplifizierung bei *in vitro* Hochdurchsatz-Verfahren (Barthelson *et al.*, 1999).

##### 4.1.1.1 Auswahl der Zelllinie

Primärzellen aus der Nase sind zur Imitierung der *in vivo* Situation per se repräsentativer als eine pulmonale Epithelzelllinie, allerdings sind Primärzellen nur begrenzt teilungs- und lebensfähig. Zudem wäre die Anwendung in einem Hochdurchsatz-Verfahren sehr kostenintensiv. Darüber hinaus variieren die Eigenschaften von Primärzellen in Abhängigkeit des Spenders. Zur Entwicklung und Anwendung eines stabilen und reproduzierbaren Assays sind Primärzellen folglich wenig geeignet und werden dementsprechend generell nur selten in Screeningprojekten primär eingesetzt. Die Assayentwicklung und die Screenings wurden in dieser Arbeit daher mit der Lungenkarzinomzelllinie A-549 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde bereits in vielen *S. aureus* Adhäsionsstudien eingesetzt (Arita *et al.*, 2004;

Weidenmaier *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006). Die adhäsionsinhibierende Wirkung der so identifizierten Substanzen ATA und PSH ließ sich unter Einsatz von humanen Primärzellen anschließend verifizieren, womit sich die Übertragbarkeit der Aktivität auf die *in vivo* Situation als realistische Möglichkeit darstellt. Diese Verifizierung befürwortet nachträglich die Wahl der Zelllinie A-549 in diesem biologischen Anwendungskontext.

#### 4.1.1.2 Optimierung der Adhäsionsbedingungen

Bei der Auswahl der Inkubationsparameter dienten verschiedene Adhäsionsassays als Orientierung: Es wurde bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert (O'Brien *et al.*, 2002; Weidenmaier *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2005; Blickwede *et al.*, 2005; Wertheim *et al.*, 2008). Aber auch bei 23 °C bzw. Raumtemperatur wurden Adhäsionsexperimente durchgeführt (Hoefnagels-Schuermans *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 1999). Inkubiert wurde für 60 min (O'Brien *et al.*, 2002; Weidenmaier *et al.*, 2004), 90 min (Hoefnagels-Schuermans *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2008) oder 120 min (van Wamel *et al.*, 1998; Blickwede *et al.*, 2005). Da die Temperatur in der Nase nicht 37 °C beträgt, sondern einige Grad darunter liegt (Holden *et al.*, 1999), wurde die Inkubation bei RT für 1 h durchgeführt. Vorversuche bestätigten, dass nach 1 h bei RT bereits gut ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen *S. aureus* und den Epithelzellen vorliegen. Zudem zeigten Vorversuche, dass nach einer zweistündigen im Vergleich zu einer einstündigen Inkubation stärkeres bakterielles Wachstum im Inkubationsmedium stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Da der Assay die Identifizierung von Adhäsionsinhibitoren adressieren sollte und nicht die Identifizierung von *S. aureus* Wachstumsinhibitoren, befürwortete dies ebenfalls die Inkubation für 1 h bei RT.

#### 4.1.1.3 Optimierung der Waschprozedur

Die Anwendung des Pipettierroboters resultierte in einer mangelnden Gleichmäßigkeit und einer unzureichenden Funktionalität des Assays. Die Höhe der Spitzen, die zum Absaugen der Überstände und Waschflüssigkeiten angesetzt wurde, wurde zur Optimierung des Prozesses im Pipettierroboter vielfach variiert. Es wurde jedoch stets beobachtet, dass wenige µl Restflüssigkeit in den Wells verblieben, deren Menge von Well zu Well variierte. Die mangelnde Gleichmäßigkeit im Gegensatz zum manuell durchgeführten Waschvorgang lässt sich vermutlich auf diese Restflüssigkeiten zurückführen, denn beim manuellen Waschvorgang wurden die Platten leicht schräg gestellt, sodass sich die Flüssigkeiten restlos mit der Vakuum-Absaugpumpe entfernen ließen. Somit zeigte sich der manuelle Waschvorgang als gut geeignete Methode.

#### 4.1.1.4 Optimierung der Quantifizierungsstrategie

In dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Markierung adhärenter *S. aureus* getestet. Die grün fluoreszierenden Farbstoffe FITC und Syto 9 erwiesen sich bei Entwicklung des Assays als ungeeignet. Die Verwendung eines *S. aureus*-Stammes, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, stellt sich experimentell aufgrund des Wegfalls der Markierungsschritte sehr attraktiv dar. Die GFP-Expression ist eines der Hauptwerkzeuge der Molekularbiologie zur Markierung von Proteinen oder Zellen. GFP wird oftmals eingesetzt, jedoch ohne zu analysieren, ob oder wie Zell- oder Gewebemetabolismus

modifiziert werden. Es wurde allerdings in einigen Studien gezeigt, dass die GFP-Expression mit veränderten bakteriellen Eigenschaften bzw. einer modifizierten Physiologie verknüpft ist (Knodler *et al.*, 2005; Allison and Sattenstall, 2007). Zur Identifizierung von Adhäsionsinhibitoren stellt sich deshalb die Arbeit mit *S. aureus*-Stämmen sinnvoll dar, die nicht artifiziell modifiziert wurden. Die Markierung der Bakterien mit Farbstoffen wie Syto 9 oder FITC ist ebenfalls ein artifizieller Eingriff. Nach Markierung von *S. aureus* mit Syto 9 konnte eine starke Reduktion der Viabilität beobachtet werden (persönliche Kommunikation Dr. Werner Tegge). Nach Markierung von *Streptococcus pneumoniae* mit FITC konnte eine signifikante Veränderung der Adhäsionseigenschaften aufgezeigt werden (Barthelson *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit durchgeführte Detektion von *S. aureus* mit Antikörpern zeichnet sich somit als eine Methode aus, bei der vor der Adhäsionsperiode kein modifizierender Eingriff an den Bakterien vorgenommen wird.

#### 4.1.1.5 Screening-Format

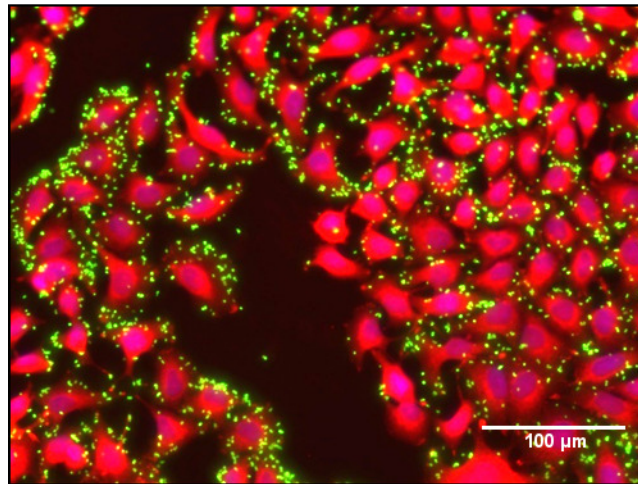
Der Assay dieser Arbeit wurde im 96-Well-MTP-Format durchgeführt. Pro Arbeitstag wurden 384 Substanzen in vier 96-Well-Platten getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adaption an das 384-Well-Format evaluiert (Daten nicht gezeigt). Die Gleichmäßigkeit sowie die Reproduzierbarkeit des Assays waren im Gegensatz zum 96-Well-Format stark herabgesetzt, sodass sich das 384-Well-Format als ungeeignet erwies. Der etablierte Assay ist per se ein komplexes, sensitives Testsystem, bei dem zwei verschiedenartige Kulturen vereint werden. Wachstum und Eigenschaften von Zellkultur und bakterieller Kultur unterliegen vielfältigen äußeren Bedingungen und werden durch Faktoren wie Kultivierungsdauer, Temperatur, Nährstoffangebot, Sauerstoffzufuhr etc. beeinflusst. Folglich wird die Stabilität des Assays von einigen natürlichen Schwankungen beeinflusst. Auch im 96-Well-Format lagen natürliche Schwankungen vor, doch je kleiner der Bereich in der Mikrotiterplatte ist, der zur Testung einer Substanz genutzt wird, desto stärker fallen einzelne Unregelmäßigkeiten im Well ins Gewicht. Zudem wäre beim Screening im 384-Well-Format zu beachten, dass das IXM die Wells der Randspalten bzw. -zeilen nicht erfassen kann. Die mangelnde Erfassung resultiert aus Einschränkungen in der Kinematik der Mechanik. Beim Screenen von Substanzsammlungen im 384-Well-Format könnte somit die Wirksamkeit von den Substanzen in den Randbereichen nicht getestet werden, was bei einer 384-Well-Screeningplatte 76 Substanzen betrifft (ca. 20 %).

#### 4.1.2 Quantifizierung mit Hilfe des IXM

Das verwendete automatische Mikroskop IXM ist ursprünglich auf Untersuchungen mit eukaryotischen Zellen konzipiert und ausgelegt (siehe 1.2). Die Quantifizierung bakterieller Adhäsionsprozesse unter Verwendung eines automatischen Mikroskops im Screeningverfahren ist nach unserem Wissen bisher noch nicht durchgeführt worden. Bildbasierte Analysen zur Quantifizierung adhärenter Bakterien stellen sich aus den im Folgenden aufgeführten Gründen sehr attraktiv dar.

Die Waschprozedur zur Entfernung nicht-adhärenter *S. aureus* war mit dem Einwirken physikalischer Kräfte auf den Zellrasen verbunden. Die Adhäsionsstärke der Epithelzellen

selbst unterliegt zahlreichen äußeren Einflüssen. Insbesondere die Anzahl und Länge von Trypsinierungsvorgängen zum Vereinzeln der Zellen vor Aussaat in die 96-Well-Platten schienen starke Auswirkungen auf die Adhäsionskräfte der Epithelzellen zu haben. So zeigte sich, dass sich bei einigen Adhäsionsexperimenten der Zellrasen stellenweise auch ohne zytotoxische Einwirkungen von Substanzen löste. Abbildung 4-1 zeigt ein mit dem IXM erstelltes Bild, auf dem geringe Zellablösungsvorgänge zu sehen sind.



**Abbildung 4-1: Adhäsion von *S. aureus* N315 an die Epithelzellen A-549**

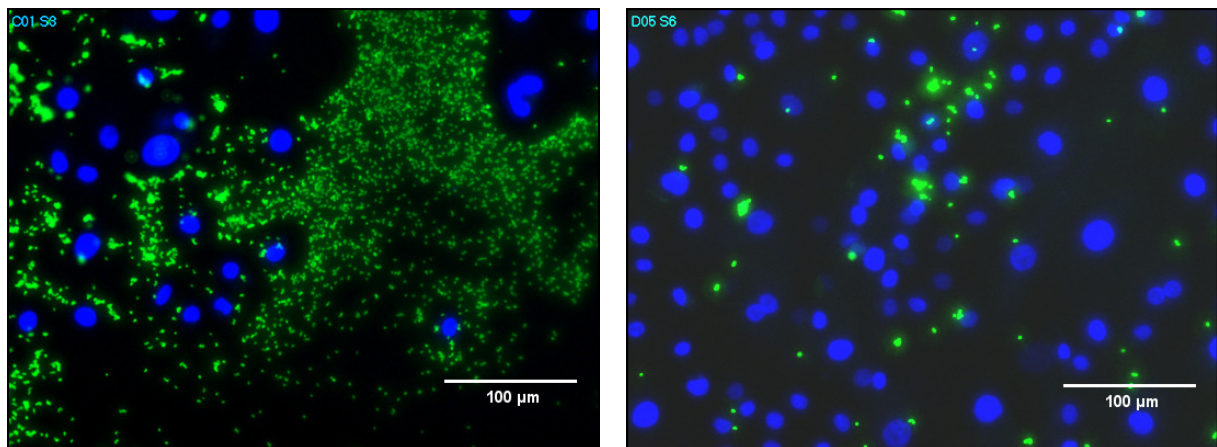
Gezeigt ist ein Bild, das mit dem IXM erstellt wurde. Die Kerne der A-549-Zellen wurden mit Dapi (blau dargestellt), das Cytoplasma mit CellTracker™ Red CMPTX (rot) und die adhärenen *S. aureus* mit einem fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markiert (grün).

Hinzu kommt der Aspekt, dass die in dieser Arbeit gescreenten Sammlungen und Bibliotheken Substanzen enthielten, die zu morphologischen Veränderungen der Epithelzellen führten. Zudem waren bzw. sind zahlreiche Substanzen (noch) nicht näher charakterisiert, sodass nichts über deren Wirkung auf Epithelzellen bekannt ist. So führte die Inkubation mit einigen Substanzen zu einem Abkugeln der Epithelzellen vom Plattenboden. Die Intensität der Zellablösung war abhängig von der Eigenschaft der Substanz bzw. der eingesetzten Konzentration, im Extrem konnte ein komplettes Ablösen des Zellrasens beobachtet werden. Dies hatte eine verminderte bzw. fehlende Adhärenz von *S. aureus* zur Folge.

Bei Zellverlusten führt die Quantifizierung adhärenter Bakterien mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts zu einer Reduzierung des Signals. So generieren zytotoxische Verbindungen oftmals zahlreiche Falsch-Positive bei zellbasierten Assays (Moore and Rees, 2001). Mit der etablierten Quantifizierungsmethode unter Anwendung des IXM wird die Identifizierung von Falsch-Positiven, die auf Zellablösungsvorgängen basiert, jedoch verhindert: Zellablösungsvorgänge beeinflussen die verwendeten Werte nicht, denn die Epithelzellen werden gleichzeitig mit der Erfassung der bakteriellen Fläche quantifiziert. Da bei Zellablösungen das Verhältnis der Bakterien zu den Epithelzellen konstant bleibt, werden diese Daten nicht beeinflusst. Führt darüber hinaus die Inkubation mit einer zytotoxischen Substanz im Extrem zu einer kompletten Ablösung des Zellrasens, können keine Bilder mit dem IXM erstellt werden. Dies wird als „Fehler“ bei der Bildanalyse ausgegeben. Folglich werden hier die Substanzen kenntlich gemacht, die stark toxisch auf die Epithelzellen wirken und nicht als Falsch-Positive erkannt.

Ein besonderer Vorteil des IXM ist die Möglichkeit, Einblick in das Adhäsionsgeschehen nehmen zu können. Die Identifizierung von Substanzen als Hit kann durch visuelle Betrachtung der erstellten Bilder schnell und effizient überprüft werden. Umgekehrt ist diese Einblicknahme ebenfalls hilfreich, wenn eine Reduktion der Adhäsion erwartet wurde, aber nicht aufgezeichnet werden konnte. Durch Auswertung der Bilder können sich Ursachen wie z. B. das Vorliegen eines großen fluoreszierenden Fremdpartikels offenbaren. Zudem können durch Substanzen bedingte morphologische Veränderungen ohne zusätzliche Arbeitsschritte visualisiert werden.

Besonders vorteilhaft war der Einsatz des IXM in dieser Arbeit bei der Verifizierung der Aktivität unter Einsatz von Primärzellen (HNEPC). Die Teilungsrate von Primärzellen ist gegenüber einer Zelllinie stark reduziert. Bereits nach der zweiten Passage machte sich bei den HNEPC eine starke Reduzierung der Zellteilung bemerkbar, sodass für die Adhäsionsstudien teilweise kein konfluenter Zellrasen vorlag. Eine vergleichende Messung der Signalstärke mit dem MTP-Lesegerät gab bei den Positionen, in denen die Zellen den Plattenboden nur inselartig bedeckten, starke Signale aus. Dies trat verstärkt in den Randbereichen der Platte auf. Ähnlich verhielt es sich bei der Quantifizierung mit dem IXM, doch mittels der visuellen Kontrolle war es möglich, die Bilder zu selektieren, bei denen große bakterielle Mengen am Plattenboden adhärten (siehe Abbildung 4-2, links). So konnten ausschließlich die Bilder mit intaktem Zellrasen für die Erhebung der Daten herangezogen werden. Folglich war das etablierte Verfahren auch bei Anwendung von Primärzellen nutzbar und zudem im Vergleich zum MTP-Lesegerät sehr vorteilhaft.



**Abbildung 4-2: Adhäsion von *S. aureus* N315 an HNEPC**

Gezeigt sind zwei Bilder, die mit dem IXM erstellt wurden. Die Kerne der HNEPC wurden mit Dapi (blau), die adhären *S. aureus* mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert (grün). Links: die HNEPC bedeckten den Boden des Wells zum Zeitpunkt des Adhäsionsexperiments nur inselartig (Bild aus dem Randbereich), sodass große Mengen *S. aureus* am Boden adhärten. Rechts: die HNEPC bedeckten diesen Ausschnitt des Wells fast komplett, es werden keine großen Mengen von *S. aureus* am Boden der MTP visualisiert.

### 4.1.3 Ergebnisse der Screenings

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Substanzsammlungen (NCH-, Var- und Lopac-Sammlung) sowie drei Peptidbibliotheken gescreent. Alle Substanzsammlungen bzw. Biblio-

theken wurden in zwei unabhängigen Screening-Durchläufen untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Der Vergleich der replikaten Datensätze zeigte bei den Substanzen der Randbereiche der MTPs starke Unterschiede. Die Betrachtung der Hit-Positionen aus der Lopac-Sammlung zeigte zudem ein überwiegendes Vorkommen in den Randbereichen. Nur zwei (darunter ATA) der 15 Hit-Substanzen lagen nicht in den Randwells. Bei der Var-Sammlung war diese Verteilung nicht aufweisbar: 17 der 45 Hit-Substanzen lagen in den Randbereichen, dies entspricht ca. 38 %. Statistisch betrachtet liegen 32 % der Hits in Randwells vor. Somit liegt beim Screening der Var-Sammlung nur ein schwacher Anstieg der statistischen Verteilung von Hits in den Randbereichen vor.

Die Lage der Hits der Lopac-Sammlung lässt eine systematische Einschränkung der Funktionalität des Assays in den Randbereichen vermuten. Bei anderen zellbasierten Assays wurde ein „Randeffekt“ beobachtet, der auf einem ungleichmäßigen Wachstum der Zellen in den Randbereichen der MTPs beruht (Lundholt *et al.*, 2003; Diestel, 2010). Die Gründe für dieses ungleichmäßige Wachstum sind bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die visuelle Kontrolle des Zellrasens nach Adhäsion ließ keine Unregelmäßigkeiten erkennen. Nach dem ersten Screeningdurchlauf der Lopac-Sammlung wurde eine andere Kryokonserven der A-549-Zellen reaktiviert und der zweite Durchlauf sowie das Screening der Var-Sammlung mit diesen Zellen durchgeführt. Die Mittelwerte des Lopac-Screenings wiesen keine höheren Standardabweichungen auf als die der Var-Sammlung. Ein Zusammenhang zwischen Kultivierungsdauer und Randeffekt geht somit aus diesen Daten nicht hervor. Der Grund für den hohen Anteil von Lopac-Hits in den Randbereichen bleibt ungeklärt. Die Testung der Nachsubstanzen sowie die weitere Untersuchung von ATA und PSH wurden aufgrund der Beobachtungen ohne Verwendung der Randbereiche durchgeführt.

Zur weiteren Testung der Hits wurden erneut vom Hersteller bezogene Substanzchargen („Nachsubstanzen“) verwendet. Dies hat folgende Gründe: Zum einen liegt dies in der Praktikabilität begründet, die den reibungslosen Ablauf weiterer Screenings gewährleisten soll. Würde aus einzelnen Wells der Substanzsammlung etwas von den positiv getesteten Substanzen für weitere Experimente entnommen werden, würde dies in Volumenschwankungen innerhalb der Screeningplatte resultieren, was erheblichen Einfluss auf Folgeversuche hat. Zum anderen ist dieses Vorgehen auch für die Aussagekraft der eigenen Experimente vorteilhaft. Unter Umständen könnten z. B. bei vorangegangenen Screenings Substanzen durch unbewusstes Verschleppen von Material verunreinigt worden sein. Desweiteren ist bei einigen Substanzen nicht gesichert und teilweise auch unbekannt, wie lange diese in ihrer nativen Konformation in Lösung stabil bleiben. Für jedes Screening werden die bei -20 °C gelagerten Screeningplatten aufgetaut und anschließend wieder eingefroren, was bei einigen Substanzen das Auftreten von Oxidationsvorgängen, Zerfall oder die Bildung von Polymeren begünstigt. Durch die Verwendung von Nachsubstanzen für Folgestudien wird all diesen Faktoren entgegen gewirkt.

Tatsächlich konnten in der vorliegenden Arbeit nicht alle Hits in Folgeexperimenten bestätigt werden. Modifizierte Strukturen oder Verunreinigungen in den Screeningplatten könnten möglicherweise diese Abweichungen in Einzelfällen bedingt haben. Die natürlichen



Schwankungen des Assays waren jedoch die Hauptursache für das Vorliegen einiger falsch-positiver Ergebnisse.

In dieser Arbeit wurden 27 Substanzen mit antibakterieller Wirkung gegen *S. aureus* N315 identifiziert, wovon fünf Substanzen MHK-Werte  $< 2 \mu\text{M}$  zeigten. Über eine dieser fünf Substanzen, HZI10687C02, ist eine antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* bereits bekannt (Zeeck *et al.*, 1979). Bei dieser Substanz handelt es sich um Xanthomegnin-diacetat. Xanthomegnin wird von verschiedenen Mikroorganismen, besonders von Pilzen (z. B. von *Penicillium citreo-viride* oder *Aspergillus melleus*) gebildet (Höfle and Röser, 1978; Zeeck *et al.*, 1979). Über die anderen vier Substanzen mit MHK-Werten  $< 2 \mu\text{M}$  ist bisher keine antibakterielle Wirkung bekannt. Diese Substanzen sind für Folgestudien sehr interessant (siehe auch Kapitel 5).

#### 4.1.4 Weitere Charakterisierung der Wirkstoffkandidaten Aurintricarbon-säure und Pseudohypericin

Insgesamt 62 Substanzen wurden bei den Screening-Durchläufen als Hits identifiziert. Die zwei Wirkstoffe ATA und PSH gehen als vielversprechende Kandidaten aus der vorliegenden Arbeit hervor. Ein weiterer Kandidat, HZI10676D08, zeigte adhäsionsinhibierende Wirkung, konnte jedoch aufgrund von Verfügbarkeitsproblemen nicht weiter untersucht werden. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Xanthan, das als Farnesyltransferase-Inhibitor (Inhibierung der Ras-Farnesylierung) Wirksamkeit zeigte (Krohn *et al.*, 2009). Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI) werden bzgl. einer Anwendung als Antitumor-Substanzen untersucht (Liu *et al.*, 2007; Geryk-Hall *et al.*, 2010). Eine adhäsionsinhibierende Wirkung ist noch nicht bekannt.

Zur weiteren Charakterisierung der Wirkstoffe ATA und PSH wurde untersucht, ob diese bereits mit *S. aureus* besiedelte A-549-Zellen wieder sanieren können. Dazu wurden die Wirkstoffe erst nach einstündiger Adhäsion von *S. aureus* N315 an die A-549-Zellen zugegeben und anschließend max. 5 h inkubiert. Für ATA wurde nach 3- bis 5-stündiger Inkubation mit  $2,2 \mu\text{g/ml}$  ATA (ermittelter  $\text{IC}_{90}$ -Wert) eine 63 bis 66 %ige Reduktion adhärenter Bakterien gezeigt. Für PSH konnte hingegen keine Reduktion gemessen werden. Die Adhäsionsreduktion war im Vergleich zur gleichzeitigen Zugabe von ATA und *S. aureus* zu den Epithelzellen reduziert, was eine direkte Adressierung adhärenter *S. aureus* durch ATA unwahrscheinlich erscheinen lässt. Wahrscheinlicher ist eine Adhäsionsinhibierung von *S. aureus*-Zellen, die während der mehrstündigen Inkubationszeit durch Wachstumsprozesse hinzugekommen sind, oder der adhäsionsinhibierende Effekt wirkt sich im Rahmen von bakteriellen Zellteilungen und damit verbundenen Membranprozessen aus. Das Ergebnis dieses Experiments hebt ATA somit nicht nur als potentiellen Wirkstoff hervor, der die Adhäsion von *S. aureus* an Epithelzellen präventiv verhindern könnte, sondern zeigt eine mögliche Anwendung zur Sanierung von mit *S. aureus* besiedelten Patienten auf. Warum für PSH in diesem Kontext keine Wirkung gezeigt werden konnte, bleibt ungeklärt.

Desweiteren wurde der Einfluss von ATA und PSH auf die Vitalität der A-549-Zellen untersucht. Nach 5tägiger Inkubation zeigten beide Substanzen Auswirkungen auf die

Vitalität/Proliferation der A-549-Zellen, allerdings lagen die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte oberhalb der bzgl. Adhäsionsinhibierung ermittelten  $IC_{50}$ -Werte. Für die Substanz ATA war die Differenz zwischen diesen beiden Werten erheblich größer als für PSH (33  $\mu\text{g/ml}$  und 0,95  $\mu\text{g/ml}$  vs. 71,1  $\mu\text{M}$  und 51  $\mu\text{M}$ ). Generell ist es in der Wirkstoffforschung offenkundig wünschenswert, dass die Differenz zwischen diesen beiden Werten so groß wie möglich ist. Allerdings dient das Screenen von Substanzen vor allem dem Aufspüren von Leitstrukturen und der grundlegenden Identifizierung aktiver Strukturelemente. Ein unmittelbares Auffinden einer hochwirksamen und zugleich selektiv wirkenden Substanz ist bei dieser Vorgehensweise eher unwahrscheinlich. Die Leitstrukturen können jedoch als Vorlage zur Synthese von Derivaten dienen, die in verschiedenen biologischen Kontexten weiter charakterisiert werden können. Solche Optimierungsprozesse werden mit den Methoden der Medizinischen Chemie, eventuell unter Anwendung Kombinatorischer Chemie durchgeführt. Der Schwerpunkt liegt in der Erstellung der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung. So können ausgehend von der identifizierten Leitstruktur Substanzen entwickelt werden, die unter Auslösung möglichst weniger unerwünschter Wirkungen eine starke Aktivität im gesuchten Anwendungskontext aufzeigen. Für den in dieser Arbeit identifizierten Kandidaten PSH wäre dies attraktiv, da hier der  $IC_{50}$ -Wert von 51  $\mu\text{M}$  bzgl. Adhäsionsinhibierung relativ hoch liegt. Zudem zeigt dieser nur eine Differenz von ca. 20  $\mu\text{M}$  zum ermittelten zellkulturbasierten Toxizitäts- $IC_{50}$ -Wert (s. o.). Für ATA ist eine Wirkstoffoptimierung ebenfalls attraktiv, denn neben einer Steigerung der Aktivität wäre eine selektive Wirkungsweise wünschenswert. Wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben, ist für ATA eine große Wirkungsvielfalt bekannt.

Neben Toxizitätstests wurden weitere Untersuchungen mit ATA und PSH durchgeführt. Da die generellen Adhäsionseigenschaften von *S. aureus* stark stammesabhängig sind (van Wamel *et al.*, 1998; Hensen *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2007), wurde die Wirkung der beiden Substanzen auf andere *S. aureus* Stämme untersucht. Alle eingesetzten *S. aureus* Stämme, die per se gut adhärten, zeigten eine Reduktion der Adhäsion unter Inkubation mit ATA und PSH. Dieses Ergebnis befürwortet eine stammesübergreifende adhäsionsreduzierende Wirkung der beiden Substanzen. Die Aktivitätsstärke bewegte sich bei den untersuchten Stämmen ungefähr im gleichen Bereich wie beim Referenzstamm. Der MRSA-Stamm 50128509 jedoch zeigte bei diesem Experiment eine deutlich stärkere Reduktion der Adhäsion durch Inkubation mit ATA. Bei diesem MRSA-Stamm könnte ATA folglich wirksamer sein als beim *S. aureus* Stamm N315. Jedoch unterliegt der Assay einigen biologischen und experimentellen Schwankungen, sodass dieser Hinweis in Folgestudien weiter untersucht werden sollte.

Zudem wurde ein möglicher Einfluss einer ü. N. Vorinkubationszeit von ATA und PSH mit den A-549-Zellen untersucht. Damit wurde die Fragestellung adressiert, ob eine Vorinkubationszeit möglicherweise die Adhäsionsreduktion verstärkt, was auf eine Wirkung der Substanzen auf die Epithelzellen hingewiesen hätte. Im nachfolgenden Adhäsionsexperiment konnte jedoch keine verstärkte Adhäsionsreduktion festgestellt werden. Im Gegenteil zeigte sich eine Reduzierung der adhäsionsinhibierenden Wirkung nach ü. N. Inkubation. Eine Ursache für diese Reduzierung könnten mögliche Substanzeigenschaften sein, denn bei der ü. N. Inkubation bei 37 °C könnten die Substanzen eventuell verschie-

denen Modifikationen aufgrund von Instabilitäten oder Reaktivitäten unterlegen haben. Somit lagen nach dieser Vorinkubation eventuell andere Strukturen bzw. Derivate vor als dies nach unmittelbarer Substanzzugabe der Fall ist.

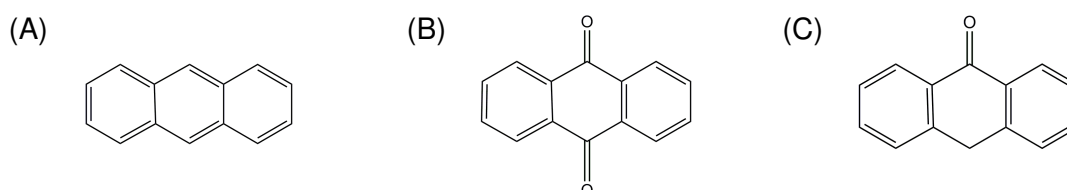
Desweiteren wurde die adhäsionsinhibierende Wirkung von ATA und PSH auf HNEPC untersucht. Die Aktivitäten lagen in denselben Bereichen wie unter Anwendung der A-549-Zelllinie, was nachträglich die Wahl dieser Zelllinie für das Screening befürwortet. Die relativen Standardabweichungen im Test mit den HNEPC und ATA waren jedoch relativ hoch. Zudem war unter Verwendung der HNEPC im Gegensatz zur Verwendung der A-549-Zellen auffällig, dass unter Inkubation mit ATA eine stärkere Reduktion der Adhäsion als 70 % – auch bei steigender ATA-Konzentration – nicht erreicht werden konnte. Diese Beobachtungen könnten darauf zurückgeführt werden, dass eine komplett problemlose Adaption des etablierten Adhäsionsassays auf die Anwendung von HNEPC nicht möglich war (siehe auch 4.1.2). Auch ist es möglich, dass bei Adhäsion an HNEPC mehrere oder zusätzlich andere Adhäsionsmechanismen involviert sind als bei Adhäsion an A-549-Zellen und diese Prozesse möglicherweise nicht oder weniger effektiv durch ATA beeinflusst werden.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von ATA und PSH auf die Sortase-Mutante *S. aureus* SA113  $\Delta srtA$  (Weidenmaier *et al.*, 2008) untersucht. Diese Mutante ist durch das fehlende Enzym Sortase defizient in allen Sortase-abhängigen Oberflächenproteinen. Auch dieses Experiment diente der Adressierung des möglichen Wirkmechanismus. Aufgrund der genetischen Modifizierung adhärierte die Mutante per se stark reduziert, was die Erhebung der Messwerte stark erschwerte. Eine Adhäsionsreduktion der Sortase-Mutante durch ATA konnte gezeigt werden, die Messwerte konnten dies für PSH jedoch nicht zeigen. Die adhäsionsreduzierende Wirkung von ATA auf *S. aureus* SA113  $\Delta srtA$  befürwortet, dass ATA keinen, oder keinen ausschließlichen, Einfluss auf Sortase-abhängige Oberflächenproteine von *S. aureus* ausübt.

ATA ist keine klar definierte Substanz, denn in Abhängigkeit vom Herstellungsprozess und den Lagerungsbedingungen enthält sie eine Vielzahl von Neben-, Umlagerungs- und Oligo- bzw. Polymerisierungsprodukten (Wang *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurde das Substanzgemisch ATA mittels HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen im Adhäsionsassay sowohl mit A-549-Zellen als auch mit HNEPC getestet. Alle Fraktionen zeigten adhäsionsinhibierende Wirkungen, einschließlich der Fraktion mit der Monomeren der ATA im Allgemeinen zugeschriebenen Struktur Nr. 2 in Abbildung 3-26. In einer publizierten Studie zur biologischen Charakterisierung einzelner ATA-Fraktionen wurden diese im Hinblick auf anti-HIV-Aktivität untersucht. Hier wurde eine Korrelation zwischen dem Molekulargewicht und der Wirksamkeit gezeigt: die Aktivität nahm mit steigendem Molekulargewicht zu (Cushman *et al.*, 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivitätszunahme mit steigendem Molekulargewicht nicht gezeigt werden. Auch in diesem Experiment wurden die adhäsionsinhibierenden Wirkstoffaktivitäten sowohl unter Anwendung von A-549-Zellen als auch von HNEPC gezeigt.

### 4.1.5 Versuche zur Identifizierung wirkungsrelevanter Strukturelemente

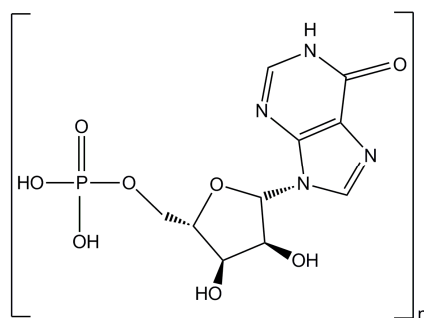
Verschiedene Experimente wurden zur Identifizierung wirkungsrelevanter Strukturelemente durchgeführt. Bei Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten adhäsionsinhibierenden Substanzen ist auffällig, dass alle Strukturen mindestens einen Benzolring aufweisen (siehe Abbildung 3-29). Diese Benzolringe liegen in Form von benzoessäure- oder phenolhaltigen Strukturen vor. Pseudohypericin und HZI10676D08 weisen durch Anellierung mehrerer Benzolringe anthrachinon- bzw. anthron-ähnliche Strukturen auf (siehe Abbildung 4-3). Anthron ist wie Anthrachinon ein Derivat des Anthracens und gilt als Wirkstoff in der Pflanzenheilkunde.



**Abbildung 4-3: Strukturen von Anthracen (A), Anthrachinon (B) und Anthron (C)**

Auch ATA enthält derartige Strukturen (siehe Abbildung 3-26, 8-10). Pseudohypericin ( $C_{30}H_{16}O_9$ ) wird wie Hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ) aufgrund seiner Struktur auch als Dianthron bezeichnet und unterscheidet sich chemisch von Hypericin nur durch das Vorliegen eines zusätzlichen Sauerstoffmoleküls (siehe Abbildung 3-13).

In Abbildung 4-4 ist die Struktur von Polyinosinsäure gezeigt, die im Adhäsionsassay als Positivkontrolle eingesetzt wurde.



**Abbildung 4-4: Struktur von Polyinosinsäure**

Auch Poly(I) weist aromatische Strukturen auf. Bei dieser Verbindung liegen keine Benzolringe im Grundgerüst vor. Einer der Grundbausteine ist Hypoxanthin, ein Derivat des Purins. Zusammen mit einer Ribose bildet Hypoxanthin ein seltenes Nukleosid der RNA: Inosin. Inosinsäure (auch Inosin-Monophosphat genannt) zeichnet sich durch die Kopplung einer Phosphatgruppe an das Inosin-Gerüst aus.

Das Wirkspektrum von Poly(I) wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Anwendung des etablierten Adhäsionsassays erhoben. Der Vergleich des aktiven Konzentrationsbereiches von Poly(I) mit dem von ATA ergab nahezu identische  $IC_{50}$ - und  $IC_{90}$ -Werte. Bei beiden Verbindungen müssen diese Angaben jedoch in Masse/Volumen getroffen werden und können nicht auf die Molare Masse bezogen werden, sodass ein direkter Vergleich der Aktivitäten erschwert wird. Ähnlich wie bei ATA ist es nicht per Definition möglich, eine

molekulare Masse für Poly(l) zu benennen, die bei Durchführung des Adhäsionsassays vorlag, da der Polymerisierungsgrad nicht bekannt ist (Nachfrage bei Lieferant Sigma-Aldrich). Die Charakterisierung der Länge dieses Polymers, die die Adhäsionsreduktion vermittelt, sollte in Folgeprojekten evaluiert werden.

Zur Identifizierung der wirkungsrelevanten Strukturen von ATA wurden zwei chemisch synthetisierte Peptide sowie Aurin im Adhäsionsassay getestet. Außerdem wurden drei Hydroxyanthrachinone getestet, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den identifizierten Wirkstoffkandidaten Pseudohypericin und HZI10676D08 aufweisen (siehe Abbildung 3-33). Bei keiner dieser Verbindungen wurde eine adhäsionsinhibierende Wirkung ermittelt. Somit wurde gezeigt, dass weder Aurin noch die mittels der Peptide imitierte Struktur von Phenolen und Carboxygruppen eine adhäsionsinhibierende Wirkung erzielen. Zudem wurde gezeigt, dass nicht (nur) das Vorliegen hydroxyanthrachinon-ähnlicher Strukturen wirkungsrelevant zu sein scheint. Eine eindeutige Identifizierung des für die Reduzierung der Adhäsion essentiellen Pharmakophors war bisher nicht möglich.

#### 4.1.6 Publierte Daten über Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin

##### 4.1.6.1 Aurintricarbonsäure

Über die Wirkweise von Aurintricarbonsäure gibt es zahlreiche Publikationen, die belegen, dass die Substanz ein vielseitiges Wirkspektrum aufweist. Im Anwendungskontext dieser Arbeit ist ATA jedoch noch nicht untersucht worden.

Bereits seit mehreren Jahrzehnten ist ATA als Nuklease-Inhibitor bekannt (Blumenthal and Landers, 1973; Hallick *et al.*, 1977). Darüber hinaus ist eine antiapoptotische Wirkung der Substanz beschrieben (Batistatou and Greene, 1991; Okada and Koizumi, 1995; Andrew *et al.*, 1999), welche (zumindest teilweise) mit einer Inhibierung der Topoisomerase II verknüpft sein könnte (Catchpole and Stewart, 1994; Benchokroun *et al.*, 1995). Die Inhibierung weiterer Enzyme wie z. B. der Alkohol-Dehydrogenase, der Cytochrom C Reduktase und der Glutathion-Reduktase ist zudem beschrieben (Thompson and Reed, 1995). Desweiteren wurde eine Hemmung von DNA- und RNA-Polymerasen gezeigt (Nakane *et al.*, 1988).

Außerdem wurde beschrieben, dass ATA als antivirales Mittel ein breites Wirkungsspektrum aufweist. So wirkt es als Neuraminidase-Hemmer des Influenza A und B Viruses (Hashem *et al.*, 2009; Hung *et al.*, 2009) und wurde als Inhibitor der Hepatitis C Virus Replikase näher charakterisiert (Chen *et al.*, 2009). Darüber hinaus sind antivirale Effekte gegen HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) beschrieben (Cushman *et al.*, 1991).

ATA wurde zudem im Zusammenhang mit weiteren Krankheitserregern untersucht. So wurde z. B. eine starke Reduzierung der Viabilität des Dünndarmparasiten *Cryptosporidium parvum* publiziert (Klein *et al.*, 2008). Außerdem wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert, dass ATA die Aktivität des essentiellen Virulenzfaktors YopH von *Yersinia pestis* hemmt (Liang *et al.*, 2003).

Eine durch ATA vermittelte Verhinderung von Thrombozytenaggregationen ließ der Substanz darüber hinaus eine potentielle pharmakologische Rolle in der Behandlung und Prävention

von Thrombosen zukommen (Phillips *et al.*, 1988; Moake *et al.*, 1989; Takiguchi *et al.*, 1996). Zur Behandlung von Arthritis fungiert ATA aufgrund entzündungshemmender Eigenschaften als Wirkstoffkandidat (Collins *et al.*, 1994).

In dieser Arbeit wurde eine Adhäsionsreduktion von *S. aureus* an humane Epithelzellen durch Inkubation mit ATA gezeigt. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus konnte hier nicht aufgeklärt werden. Denkbar wäre beispielsweise eine Änderung der Genexpression von Adhäsionsfaktoren des Bakteriums durch ATA. Ebenso könnte eine ATA-vermittelte Modifizierung der Epithelzellen-Oberflächenproteine vorgelegen haben. Der Wirkmechanismus sollte in künftigen Studien weiter verfolgt werden.

#### 4.1.6.2 Pseudohypericin

Die Substanz Pseudohypericin stammt aus *Hypericum perforatum*, dem Echten Johanneskraut (im engl. auch bekannt als St. John's Wort). *Hypericum perforatum* findet schon seit Jahrhunderten Anwendung als Arzneipflanze zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen und es gibt Studien, die diese antidepressive Wirkung wissenschaftlich belegen (Gambarana *et al.*, 2001; Bach-Rojecky *et al.*, 2004). Diese Wirkung wird hauptsächlich dem Inhaltsstoff Hyperforin zugeschrieben (Gambarana *et al.*, 2001; Leuner *et al.*, 2007).

Hypericin und Pseudohypericin sind neben Hyperforin weitere Hauptbestandteile des *Hypericum perforatum*. Extrakte verschiedener *Hypericum*-Spezies zeigen antimikrobielle Wirkung gegen unterschiedliche Bakterien, darunter auch gegen *S. aureus* (Reichling *et al.*, 2001; Cecchini *et al.*, 2007). Dabei gibt es Hinweise, die Hypericin und Hyperforin als Hauptbestandteile zur Vermittlung des antimikrobiellen Effekts hervorheben (Schempp *et al.*, 1999; Cecchini *et al.*, 2007).

Protohypericin und Protopseudohypericin sind weitere Inhaltsstoffe des *Hypericum perforatum*. Nach bisherigen Erkenntnissen stellen diese die Vorstufen in der Hypericin- bzw. Pseudohypericin-Synthese dar, welche unter Lichtexposition abgeschlossen wird (Poutaraud *et al.*, 2001). Die quantitative Analyse mehrerer *Hypericum perforatum* Extrakte ergab prozentual einen ca. 3 mal höheren Pseudohypericingehalt im Vergleich zum Hypericingehalt (Mauri and Pietta, 2000).

Die biologische Wirkung von Hypericin wurde in diversen Studien näher charakterisiert, zur Wirkung des Pseudohypericins ist bislang nur sehr wenig bekannt (Karioti and Bilia, 2010).

Sowohl Pseudohypericin als auch Hypericin zeigen Instabilitäten, insbesondere bzgl. Lichtexposition. Studien demonstrierten jedoch, dass Standardlösungen beider Komponenten, gelagert bei -20 °C unter Lichtabschluss, während des gesamten Versuchszeitraumes von 140 Tagen stabil blieben (Wirz *et al.*, 2001). Bei Lichtexposition oder Erhöhung der Temperatur stellte sich Pseudohypericin im Gegensatz zu Hypericin weniger stabil dar (Wirz *et al.*, 2001).

Hypericin ist zudem als Antitumor-Substanz (VanderWerf *et al.*, 1996; Agostinis *et al.*, 2002) sowie als antiviral-wirkende Substanz (Lavie *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1996) von Interesse.

Außerdem wurde demonstriert, dass die Extrakte mehrerer Arzneipflanzen, darunter auch *Hypericum perforatum*, die Aktivität von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs - *Cell adhesion molecules*) inhibieren (Spelman *et al.*, 2011). CAMs vermitteln als integrale Membranproteine Kontakte zwischen den einzelnen Zellen eines Gewebes.

Auch der Wirkmechanismus des PSH als Adhäsionsinhibitor ist derzeit unklar und sollte in künftigen Studien adressiert werden.

## 4.2 Protein-Protein-Interaktionsstudien

In der vorliegenden Arbeit wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt, um im nasalen Adhäsionsprozess essentielle Sequenzen zu identifizieren. Die Kenntnis solcher Sequenzen stellt sich als hilfreich dar in Bezug auf die zielgerichtete Entwicklung von Inhibitoren der Schleimhautbesiedlung. So könnten sequenzspezifische Inhibitoren wie z. B. Peptide synthetisiert werden, die die Protein-Bindestellen an der Oberfläche von *S. aureus* blockieren. Solch eine Blockierung sollte folglich eine Reduzierung der Adhäsion zur Folge haben.

Bei der Erzeugung der SPOTs auf den Membranen wurden neben den kanonischen Sequenzen auch Sequenzen erzeugt, die aus sogenannten „Sequenzkonflikten“ resultierten und zum Teil natürlich vorkommende Variationen widerspiegeln (siehe 3.2.1). Diese parallele Erzeugung hatte zum Ziel, direkte Unterschiede in der Bindeeffizienz einer kanonischen Sequenz im Vergleich zur zugehörigen Variation detektieren zu können. Die Identifizierung solcher Unterschiede in Abhängigkeit der AS-Abfolge stellt sich sehr interessant dar bzgl. der Verteilung der *S. aureus* Trägerschaft in der Population. Eine gezielte Erhebung der AS-Abfolge der identifizierten Sequenz bei Trägern und Nicht-Trägern könnte solch vorläufigen Ergebnissen folgen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente führten nicht zur Identifizierung essentieller Sequenzen. Zur Aufklärung der möglichen Ursachen wurden die rekombinanten Proteine sowohl bzgl. ihrer Korrektheit (MS, Edman-Abbau) getestet als auch die Faltung mittels CD-Spektroskopie überprüft. Zudem wurde die Bindung an nasale humane Primärzellen untersucht. Für rClfB und rSdrC konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die Proteine in korrekt gefalteter Konformation vorliegen. Somit ist es wahrscheinlich, dass diese Proteine aufgrund ihrer fehlenden räumlichen Struktur keine Interaktion mit den Sequenzen auf der SPOT-Membran eingegangen sind. Die Untersuchungen des rIsdA ließen auf eine Faltung des Proteins schließen. Dieses Protein stellt mit einer Größe von 36 kDa das Kleinste unter den in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteinen dar. Es ist beschrieben, dass rIsdA eine Bindung mit allen in dieser Arbeit eingesetzten humanen Proteinen eingeht. Mögliche Ursachen für die fehlende Detektion einer Bindung des rIsdAs an die SPOT-Peptide werden im Folgenden näher ausgeführt:

Aufgrund der Erzeugung einzelner kurzer, linearer Peptidsequenzen der humanen Proteine auf der SPOT-Membran war es nur möglich, Bindestellen zu identifizieren, die in linearer

Form vorliegen. Diskontinuierliche Epitope bzw. Bindestellen konnten nicht erkannt werden. Als diskontinuierliches Epitop wird eine Aminosäuresequenz bezeichnet, die nur im nativen Zustand eines Proteins vorhanden ist. Die Primärstruktur des Proteins weist dieses Epitop nicht auf, sondern es existiert aufgrund der Faltung des Proteins und der daraus folgenden räumlichen Struktur. Somit ergibt sich als mögliche Ursache für die mangelnde Identifizierung einer rlsdA-Bindestelle, dass diese eventuell nur in nativer Form der humanen Proteine vorliegt und somit rlsdA nicht binden konnte.

Ein weiterer möglicher Grund ist mit der Länge der erzeugten Peptide assoziiert: Es ist derzeit noch nicht bekannt, wieviele Aminosäuren die Sequenz aufweist, die für lsdA als Interaktionsstelle fungiert. Falls diese Sequenz eine größere Anzahl an Aminosäuren umfasst als die auf den Membranen erzeugten Sequenzen von 15 bis 18 Aminosäuren, kommt es nicht zu einer ausreichend stabilen Bindung durch rlsdA.

Eine weitere mögliche Ursache könnte die Maskierung von Bindungsereignissen durch die hohe Anzahl unspezifischer Wechselwirkungen sein. Ungefähr die Hälfte der Peptidsequenzen wurde durch die Antikörper unspezifisch detektiert. Da bereits nach alleiniger Inkubation mit den Antikörpern eine Signalstärke erreicht wurde, die nach nur kurzem Auflegen (ca. 3 sek) des Films starke Signale hervorbrachte, ist eine Steigerung des Signals durch zusätzliche Bindung des rlsdAs möglicherweise nicht erkennbar gewesen.

Darüber hinaus ist es möglich, dass die angewandte Methode nicht sensitiv genug war, um gebundenes rlsdA zu detektieren, obwohl das sehr sensitive Chemilumineszenzverfahren angewandt wurde.

Eine weitere potentielle Ursache ergibt sich aus den C- und N-terminalen Tags der exprimierten Proteine. Es ist prinzipiell nicht auszuschließen, dass die Tags die Bindung behinderten.

Zudem könnte die mangelnde Detektion mit einer unzureichenden Stärke der Wechselwirkungen von rlsdA mit den Peptidsequenzen assoziiert sein. Die Bindung von rlsdA an die Peptidsequenz(en) könnte sich so schwach dargestellt haben, dass gebundenes Protein bei nachfolgenden Waschschritten und bei Inkubation mit den Antikörpern wieder von der Bindestelle abdissoziiert ist.

### 4.3 Transkriptomanalysen

Transkriptomanalysen wurden zur Ermittlung des bestgeeigneten Inkubationsmediums sowie einer optimalen Wachstumsphase von *S. aureus* für die Entwicklung des Adhäsionsassays durchgeführt. Gleichmaßen dienen die Daten der näheren Charakterisierung medien- und wachstumsphasenabhängiger Genexpressionen. Aus zeitlichen sowie experimentellen Gründen waren die Etablierung des Adhäsionsassays und die Screeningprozesse abgeschlossen, bevor die Transkriptomdaten zur Verfügung standen. Die Daten bieten jedoch Hilfe für den experimentellen Aufbau verschiedener künftiger Untersuchungen, besonders für Adhäsions- bzw. Pathogenitätsstudien.



Sowohl in BHI als auch in ANM wurden Transkriptomanalysen zu mehreren Wachstumsphasen erhoben. Diese Daten zeigen eine Reprimierung der Expression der Adhäsionsgene mit zunehmender Wachstumszeit (siehe Abbildung 3-43). Diese Ergebnisse lassen sich mit verschiedenen Publikationen vereinbaren. *S. aureus* besitzt drei globale Regulatoren - *agr*, *sae* und *sar* - die die Expression von Virulenzgenen beeinflussen (Recsei *et al.*, 1986; Cheung *et al.*, 1992; Giraudo *et al.*, 1994). Gene, die für Oberflächenproteine und Adhäsine kodieren, werden am stärksten in der exponentiellen Phase exprimiert. Eine Reprimierung erfolgt in der post-exponentiellen und stationären Phase, vermittelt durch das globale Regulationssystem *agr* (*accessory gene regulator*) (Saravia-Otten *et al.*, 1997). Toxine und Exotoxine werden verstärkt in der post-exponentiellen und stationären Phase synthetisiert (Harris *et al.*, 2002).

Der Einfluss der Wachstumszeit von *S. aureus* N315 auf die Adhäsionsstärke wurde in dieser Arbeit unter Anwendung des Adhäsionsassays untersucht (siehe Abbildung 3-1). *S. aureus* N315 wurde dazu in den beiden Vollmedien BHI und BM vorkultiviert. Es konnten nach Vorkultivierung in BHI keine bedeutsamen zeitabhängigen Unterschiede in der Adhäsionsstärke im Assay aufgezeigt werden. Zu den Kultivierungsbedingungen des Assays wurden auch Transkriptomdaten erhoben: Hier wurde *S. aureus* N315 sowohl nach 2 h als auch nach ü. N.-Kultivierung in BHI in Infektionsmedium überführt und die RNA nach 1,5stündiger Inkubation isoliert. Der Vergleich dieser beiden Transkriptomprofile zeigt keine bedeutsamen Unterschiede in der Expression der Adhäsionsgene, was sich gut mit der zeitlich gleichbleibenden Adhäsionsstärke im Assay vereinbaren lässt. Die Vorkultivierungsdauer in BHI vor Umpufferung in Infektionsmedium scheint folglich keinen bedeutsamen Unterschied auf die Expression der Adhäsionsgene bzw. auf die Adhäsion auszuüben.

Ein Unterschied im Expressionsprofil der Adhäsionsgene liegt jedoch bei Vergleich der Profile „BHI-Infektionsmedium“ und „BM-Infektionsmedium“ vor. Die Vorkultivierung in beiden Vollmedien wurde ü. N. durchgeführt. Besonders auffällig ist eine starke Hochregulierung der *isd*-Gene in „BHI-Infektionsmedium“ im Vergleich zu „BM-Infektionsmedium“ sowie allen anderen untersuchten Kultivierungsbedingungen. Die Isd-Proteine sind für die Bindung von eisenhaltigen Proteinen wie Hämen, Hämoglobinen oder Transferrinen bedeutsam (Taylor and Heinrichs, 2002; Clarke *et al.*, 2004; Vermeiren *et al.*, 2006; Grigg *et al.*, 2007; Villareal *et al.*, 2008). Als Infektionsmedium wurde RPMI mit Zusatz von 1 % FCS und 20 mM Hepes verwendet. In diesem Medium ist *S. aureus* Eisenmangel ausgesetzt, sodass eine Induktion der Expression der *isd*-Gene biologisch zu erklären ist. Die Möglichkeit, Eisen vom Wirt zu akquirieren, ist eine wichtige Eigenschaft pathogener Organismen. In „BM-Infektionsmedium“ lag keine Induktion der *isd*-Gene vor, was eventuell mit Eisenspeichervorgängen begründet werden kann. *S. aureus* kann Eisenspeicherproteine wie das Ferritin (kodiert von *ftnA*) exprimieren. Die Transkriptomdaten zeigen nach 8 h Kultivierung in BM im Vergleich zur Kultivierung in BHI eine Hochregulierung des Gens *ftnA*. Dies unterstützt die Hypothese einer verstärkten Eisenspeicherung unter Kultivierung in BM im Gegensatz zur Kultivierung in BHI.

BM und LB unterscheiden sich bzgl. ihrer Zusammensetzung nur minimal voneinander. Bei BM handelt es sich um LB, dem 0,1 % Glucose und 0,1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugesetzt wurde. Die

Transkriptomprofile, die hier nach Wachstum in der früh-stationären Phase erhoben wurden, unterscheiden sich insbesondere in einer signifikanten Induktion der *cap*-Gene in BM im Gegensatz zu LB. Extracelluläre capsuläre Polysaccharide (CP), für deren Synthese die Expression der *cap*-Gene essentiell ist, werden *in vitro* in Abhängigkeit des Nährstoffangebots exprimiert (O’Riordan and Lee, 2004). Die Addition von Glucose als C-Quelle wurde als starker Induktor der CP-Produktion beschrieben (Poutrel *et al.*, 1995), was die Hochregulation der *cap*-Gene in BM erklärt. In nasopharyngealem Gewebe wurden 3,9 bis 5,8 mmol/Liter Glucose nachgewiesen (Exley *et al.*, 2005), was in etwa der Menge entspricht, die BM zugefügt wurde. Zudem reguliert das Quorum Sensing System Agr die *cap*-Expression positiv (Dassy *et al.*, 1993; Luong *et al.*, 2002).

Das Genexpressionsprofil der Adhäsionsgene (Abbildung 3-43) zeigt, dass in ANM im Vergleich zu den anderen Medien die meisten Adhäsionsgene hochreguliert vorliegen. Unter Vergleich beider untersuchten Wachstumsphasen in ANM sind die meisten Gene in der exponentiellen Phase hochreguliert. Folglich heben diese Studien ANM als das optimale Medium unter den in dieser Arbeit untersuchten Medien hervor, um bei Experimenten möglichst viele Adhäsionsgene stark exprimiert vorliegen zu haben. Als optimale Kultivierungsphase ließ sich aus diesen Daten die exponentielle Phase ermitteln.

Bei Vergleich der Daten ANM5h vs. BHI2h sowie ANM8h vs. BHI4h wurde die Expression der Adhäsionsgene gesondert betrachtet. Diese Daten zeigten 36 % bzw. 34 % der 47 Adhäsionsgene in ANM5h bzw. ANM8h im Vergleich zu BHI2h bzw. BHI4h signifikant hochreguliert. Nur 6 % bzw. 17 % der Adhäsionsgene waren in ANM5h bzw. ANM8h im Vergleich zu BHI2h bzw. BHI4h signifikant runterreguliert. Dies unterstreicht ebenfalls ANM als das optimale Medium und hebt zudem die exponentielle als geeignetere Phase im Vergleich zur post-exponentiellen Phase hervor (6 % vs. 17 % der Adhäsionsgene reprimiert). Diese Ergebnisse sind kongruent mit den Studien, die eine Reprimierung von Adhesinen und Oberflächenproteinen in der post-exponentiellen und stationären Phase beschreiben (Saravia-Otten *et al.*, 1997).

Die Proteine IsdA, ClfB, SdrC und SdrD wurden in der Literatur als essentielle *S. aureus* Oberflächenproteine für den nasalen Adhäsionsprozess beschrieben (Corrigan *et al.*, 2009). Eine Hochregulierung der Gene *isdA*, *clfB*, *sdrC* und *sdrD* in ANM im Vergleich zu den anderen Kultivierungsbedingungen konnte jedoch bei diesen Transkriptomanalysen nicht gezeigt werden. Im Gegenteil zeigte der Vergleich ANM5h vs. BHI2h sowie der Vergleich ANM8h vs. BHI4h eine Runterregulierung der drei Gene *sdrC*, *sdrD* und *sdrE*. Das Gen *isdA* lag in ANM5h vs. BHI2h signifikant hochreguliert vor, in ANM8h vs. BHI4h jedoch runterreguliert. *clfB* lag bei diesen beiden Vergleichen nicht reguliert vor. Unter dem Aspekt, dass ANM zur Imitierung des Nasenmilieus *in vitro* am besten geeignet sein sollte, wäre eine Induktion dieser vier Adhäsionsgene im Vergleich zu den anderen Medien zu erwarten gewesen. Allerdings wurden die Transkriptomanalysen mit *S. aureus* N315 durchgeführt, der 1982 aus einem Rachenabstrich isoliert wurde. Es ist bekannt, dass Isolate verschiedener Lokalisationen unterschiedliche Adhäsionskinetiken aufweisen (Peacock *et al.*, 2000). So ist es denkbar, dass bei Transkriptomanalysen mit einem nasalen Isolat die vier Gene *isdA*, *clfB*, *sdrC* und *sdrD* in ANM im Vergleich zu BHI (oder einem anderen Vollmedium) hochreguliert

vorliegen würden. Zudem sind die Transkriptomanalysen in Abwesenheit von humanen Epithelzellen erhoben worden. Denkbar wäre, dass *S. aureus* auf die Präsenz von Wirtszellen reagiert und entsprechende Genregulationen stattfinden.

Anreicherungsanalysen wurden anhand der Daten ANM5h vs. BHI2h sowie ANM8h vs. BHI4h durchgeführt. Die Analysen zeigten eine signifikante Anreicherung von GO-terms, die die Virulenz des Bakteriums beschreiben. Diese Daten stellen ANM nicht nur als das optimale Medium für Adhäsionsexperimente heraus, sondern zeigen zusätzlich die Relevanz des Mediums für Pathogenitätsstudien – weit über den Pathogenitätsaspekt Adhäsion hinaus. Insbesondere ist das Medium zudem per se für Studien geeignet, die die Situation in den Nasenvorhöfen *in vitro* simulieren sollen.

Zudem bieten die Transkriptomdaten künftig Hilfe bei der Auswahl eines optimalen Mediums sowie eines optimalen Kultivierungszeitpunkts im Hinblick auf ein bestimmtes Anwendungsziel. Ist beispielsweise eine starke Induktion der *cap*-Gene im untersuchten Kontext essentiell, sollte *S. aureus* in BM kultiviert und in der (früh-)stationären Phase für das Experiment eingesetzt bzw. untersucht werden.

Die Gruppe der *ica*-Gene lag in ANM in der exponentiellen Phase am stärksten exprimiert vor. Die untersuchten *ica*-Gene sind für die Ausbildung von Biofilmen durch Synthese des *Polysaccharid intracellular adhesin (PIA)* bedeutsam. Die Biofilmbildung verleiht dem Bakterium eine bedeutsame Relevanz als Pathogen, da Zellen im Inneren des Biofilms geschützt vorliegen und somit nicht oder nur bedingt für Antibiotika oder andere Wirkstoffe zugänglich sind. In einer Studie zur Inhibierung der *S. aureus*-Biofilmbildung wurde das dort angewandte Nährmedium optimiert (Tegge, 2008). Unter Betrachtung der Transkriptomdaten könnte ANM eine Alternative zu diesem Medium zur Biofilmbildung darstellen. Die Biofilmbildungs-Kinetiken in diesen beiden Medien sollten im direkten Vergleich untersucht werden.



## 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Substanzen Aurintricarbonsäure sowie Pseudohypericin als Inhibitoren der Adhäsion von *S. aureus* an humane Epithelzellen identifiziert. *In vivo* Untersuchungen der Substanzaktivitäten zur Eradikation nasaler Besiedlungen stellen den nächsten essentiellen Schritt zur Evaluierung der Wirkstoffe als potentielle Therapeutika dar. Zur *in vivo* Untersuchung der nasalen Adhäsion von *S. aureus* stehen nur wenige geeignete Tiermodelle zur Verfügung. Als gut geeignetes Kleintiermodell hat sich die Baumwollratte besonders etabliert (Kokai-Kun, 2008). Entgegen der Bezeichnung handelt es sich um einen Vertreter der Neuweltmäuse. Das Baumwollrattenmodell zu Untersuchungen der nasalen Besiedlung wurde u. a. in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Peschel (Universität Tübingen) etabliert und angewandt (Weidenmaier *et al.*, 2004; Burian *et al.*, 2010). Die Etablierung dieses Modells am HZI wird zurzeit verfolgt und eine entsprechende *in vivo* Untersuchung beider Wirkstoffe noch im Jahr 2011 angestrebt.

Beide Wirkstoffe ATA und PSH können als Leitstrukturen verwendet werden, um die Aktivitäten zu optimieren und die Toxizitäten zu reduzieren. Zudem kann der etablierte Adhäsionsassay für die weitere Testung von Substanzsammlungen und Bibliotheken angewendet werden.

Versuche zur Identifizierung adhäsionsinhibierender, wirkungsrelevanter Strukturelemente durch Verwendung von Substanzen mit verschiedenen, in ATA und Pseudohypericin enthaltenen Grundstrukturen waren nicht erfolgreich. Offensichtlich ist die Aktivität relativ eng an die spezifischen Strukturen gebunden. Ein wichtiges Ziel bzgl. der Aufklärung der Wirkmechanismen wäre die Identifizierung der Bindungspartner der Wirksubstanzen, insbesondere von ATA. Möglicherweise ließen sich diese Targets durch Affinitätsanreicherungs-schritte oder Pulldown Assays identifizieren. Zurzeit ist allerdings noch unklar, ob die inhibierende Wechselwirkung auf Seiten der Bakterien oder der Epithelzellen lokalisiert ist oder ob von den Zellen sezernierte Moleküle das Target sind.

Um einen möglichen Einfluss von ATA und PSH auf die Genexpression von *S. aureus* zu untersuchen, stellt sich die Durchführung von Transkriptomanalysen als vielversprechender Ansatz dar. Optimal wäre hierbei die Erhebung des Transkriptom-Profiles unter den Adhäsionsbedingungen, die bei Durchführung des etablierten Assays vorliegen. Experimentell sollte mRNA direkt nach der einstündigen Adhäsionsinkubation isoliert werden. Bei diesem Ansatz müssten durch geeignete Verfahren die eukaryotischen A-549-Zellen von den Bakterien getrennt oder eukaryotische mRNA von prokaryotischer mRNA separiert werden. Letzteres ist z. B. mit dem „MICROBEnrich™ Kit“ von Ambion möglich, welches sich die Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischer RNA zunutze macht. Spezifische Oligonukleotide binden eukaryotische 18S und 28S rRNAs sowie polyadenylierte RNAs und werden anschließend durch Fängermoleküle von prokaryotischer RNA separiert. Falls die Ausbeute an prokaryotischer mRNA für die spätere Hybridisierungsreaktion zu gering ist, wäre eine Amplifizierung mit dem „MessageAmp™ II Bacteria RNA Amplification Kit“ von Ambion möglich. Der vorliegende Mechanismus beruht hier auf einer Polyadenylierung der RNA, sodass anschließend eine reverse Transkription mittels Oligo(dT) Primer (Anlagerung an

Poly(A)-Schwanz) erfolgen kann. Die gewonnene cDNA wird schließlich zur Erzeugung von Antisense-RNA mittels *in vitro* Transkription eingesetzt.

Um einen möglichen Einfluss der Substanzen auf das Proteom von *S. aureus* zu beleuchten, könnten Proteom-Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese durchgeführt werden.

High-Content-Analysen könnten mögliche phänotypische Veränderungen der Epithelzellen anzeigen. Bei diesen Analysen werden die Zellen mit verschiedenen Substanzen bekannter Wirkmechanismen sowie mit den Wirkstoffkandidaten inkubiert und anschließend unter Anwendung von Fluoreszenzmikroskopie phänotypisch untersucht. Unter Vergleich der phänotypischen Veränderungen durch bekannte Substanzen mit den phänotypischen Veränderungen der Wirkstoffkandidaten können Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen gewonnen werden (Diestel, 2010).

In dieser Arbeit wurden 27 Substanzen mit antibakterieller Wirkung gegen *S. aureus* N315 identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die gefundenen antibakteriellen Aktivitäten nicht weiter verfolgt werden, dies sollte aber künftig durchgeführt werden. Besonders interessant im Zusammenhang mit den zunehmenden Resistenzentwicklungen ist die gegen einen MRSA-Stamm bestehende Wirksamkeit. MHK-Wert-Bestimmungen sowohl mit verschiedenen *S. aureus* Stämmen und Isolaten als auch mit weiteren Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien sollten durchgeführt werden, um das Wirkungsspektrum näher zu charakterisieren. Toxizitätstests mit verschiedenen Zelllinien sollten mit den Substanzen erhoben werden, um die Wirkung auf die Vitalität bzw. Proliferation eukaryotischer Zellen zu beleuchten. Insbesondere sind hier die vier Substanzen mit bisher unbekannter antibakterieller Wirkung gegen *S. aureus* interessant, die einen MHK-Wert  $< 2 \mu\text{M}$  aufwiesen.

Polyinosinsäure wurde in der vorliegenden Arbeit als adhäsionsinhibierende Kontrollsubstanz eingesetzt und zudem der aktive Konzentrationsbereich unter Anwendung des etablierten Assays ermittelt. Es ist nichts über den vorliegenden Polymerisierungsgrad bekannt und folglich nicht, welche Polymerlänge(n) die Aktivität vermittelte. Zur Definition des wirkungsrelevanten Polymerisierungsgrades sollten verschiedene Längen dieses Polymers chemisch synthetisiert und die Varianten im Adhäsionsassay auf Aktivität getestet werden, um weitere Informationen über wirkungsrelevante Strukturelemente zu erhalten.

Die Substanz HZI10676D08 wurde in dieser Arbeit ebenfalls als adhäsionsinhibierende Substanz identifiziert, konnte jedoch aufgrund von Verfügbarkeitsproblemen nicht weiter untersucht werden. Die Aktivität dieser Substanz sollte ebenfalls durch Adhäsionsstudien unter Anwendung von HNEPC sowie verschiedenen *S. aureus* Stämmen verifiziert werden. Auch Toxizitätstests mit Säugerzellen sollten erhoben werden.

Adhäsionsrelevante humane Proteinsequenzen unter Anwendung von Peptid-SPOT-Membranen konnten in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Die mangelnde Bindung der Proteine rClfB, rSdrC und rSdrD könnte auf fehlende Faltungseigenschaften zurückgeführt werden. Versuche zur Faltung dieser drei Proteine, z. B. unter Anwendung von Hochdruck (Qoronfleh *et al.*, 2007; Seefeldt *et al.*, 2009), wären eine Möglichkeit, dieses Problem zu adressieren.

Die Transkriptomdaten dieser Arbeit zeigten, dass ANM ein besonders gut geeignetes Medium für Studien zur Pathogenität, insbesondere auch für Adhäsionsstudien, sein sollte. ANM wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Peschel (Universität Tübingen) entwickelt und stand nur in begrenzter Menge zur Verfügung, sodass im Rahmen dieser Arbeit keine Adhäsionsversuche damit durchgeführt werden konnten. Zur Korrelation der Transkriptomdaten mit den tatsächlichen Adhäsionskinetiken sollte der Assay mit ANM als Vorkultivierungs- sowie Infektionsmedium durchgeführt werden. Diese Adhäsionsstärken sollten mit denen verglichen werden, die unter den Kultivierungsbedingungen dieser Arbeit gemessen wurden. Basierend auf den Transkriptomdaten wäre eine stärkere Adhäsion nach Kultivierung in ANM zu erwarten, denn hier lagen im Vergleich viele Adhäsionsgene signifikant hochreguliert vor. Allerdings sind nicht alle der betrachteten Adhäsionsgene für die Adhäsion an humane Epithelzellen essentiell. Auch ein *S. aureus* Isolat aus den Nasenvorhöfen sollte für Adhäsionsstudien in ANM eingesetzt und die Adhäsionsstärke mit der des Stammes *S. aureus* N315 verglichen werden. Möglicherweise ließen sich durch die direkte Korrelation der Adhäsionsexperimente mit den Transkriptomdaten weitere, essentielle Adhäsionsfaktoren identifizieren.

Bei Fokussierung bestimmter Gene in künftigen Experimenten dienen die erstellten Transkriptom-Daten als wertvolle Hilfe zur Wahl des optimalen Kultivierungsmediums sowie der Wachstumsphase.





## 6 Literaturverzeichnis

- Agerer, F., Waeckerle, S. und Hauck, C. R. (2004).** Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *Journal of Microbiological Methods* **59**(1): 23-32.
- Agilent (2004).** RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control. *Agilent Technologies*.
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W. und de Witte, P. A. M. (2002).** Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**(3): 221-241.
- Allison, D. G. und Sattenstall, M. A. (2007).** The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *Journal of Applied Microbiology* **103**(2): 318-324.
- Almeida, R. A., Matthews, K. R., Cifrian, E., Guidry, A. J. und Oliver, S. P. (1996).** Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **79**: 1021-1026.
- Amaral, M. M., Coelho, L. R., Flores, R. P., Souza, R. R., Silva-Carvalho, M. C., Teixeira, L. A., Ferreira-Carvalho, B. T. und Figueiredo, A. M. S. (2005).** The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant Staphylococcus aureus has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases* **192**(5): 801-810.
- Andrew, D. J., Hay, A. W. M. und Evans, S. W. (1999).** Aurintricarboxylic acid inhibits apoptosis and supports proliferation in a haemopoietic growth-factor dependent myeloid cell line. *Immunopharmacology* **41**(1): 1-10.
- Aristoteli, L. P., Bojarski, B. und Willcox, M. D. P. (2003).** Isolation of conjunctival mucin and differential interaction with Pseudomonas aeruginosa strains of varied pathogenic potential. *Experimental Eye Research* **77**(6): 699-710.
- Arita, Y., Joseph, A., Koo, H.-C., Li, Y., Palaia, T. A., Davis, J. M. und Kazzaz, J. A. (2004).** Superoxide dismutase moderates basal and induced bacterial adherence and interleukin-8 expression in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**(6): L1199-L1206.
- Ascencio, F., Martinez-Arias, W., Romero, M. J. und Wadström, T. (1998).** Analysis of the interaction of Aeromonas caviae, A. hydrophila and A. sobria with mucins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **20**(3): 219-229.
- Aydinuraz, K., Agalar, C., Agalar, F., Ceken, S., Duruyürek, N. und Vural, T. (2009).** In Vitro S. epidermidis and S. aureus Adherence to Composite and Lightweight Polypropylene Grafts. *The Journal of surgical research* **157**(1): e79-e86.
- Babu, T., Rekasius, V., Parada, J. P., Schreckenberger, P. und Challapalli, M. (2009).** Mupirocin Resistance among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus-Colonized Patients at Admission to a Tertiary Care Medical Center. *J. Clin. Microbiol.* **47**(7): 2279-2280.

- Bach-Rojecky, L., Kalodjera, Z. und Samarzija, I. (2004).** The antidepressant activity of *Hypericum perforatum* L. measured by two experimental methods on mice. *Acta Pharm.* **54**(2): 157-62.
- Barthelson, R., Hopkins, C. und Mobasser, A. (1999).** Quantitation of bacterial adherence by image analysis. *Journal of Microbiological Methods* **38**: 17-23.
- Batistatou, A. und Greene, L. A. (1991).** Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *The Journal of Cell Biology* **115**(2): 461-471.
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A. und Trumble, W. R. (1998).** Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis. *Infect. Immun.* **66**: 336-342.
- Benchai, M., Delorme, R., Pluvineau, M., Bryon, P. und Souchier, C. (1996).** Evaluation of five green fluorescence-emitting streptavidin-conjugated fluorochromes for use in immunofluorescence microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* **106**(2): 253-256.
- Benchokroun, Y., Couprie, J. und Larsen, A. K. (1995).** Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Biochemical Pharmacology* **49**(3): 305-313.
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995).** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**: 289-300.
- Bibel, D. J., Aly, R., Shinefield, H. R., Maibach, H. I. und Strauss, W. G. (1982).** Importance of the Keratinized Epithelial Cell in Bacterial Adherence. *J Invest Dermatol* **79**(4): 250-253.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G. und Götz, F. (2006).** Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters* **259**(2): 260-268.
- Blickwede, M., Goethe, R., Wolz, C., Valentin-Weigand, P. und Schwarz, S. (2005).** Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**(2): 315-323.
- Blot, S. I., Vandewoude, K. H., Hoste, E. A. und Colardyn, F. A. (2002).** Outcome and Attributable Mortality in Critically Ill Patients With Bacteremia Involving Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* **162**(19): 2229-2235.
- Blumenthal, T. und Landers, T. A. (1973).** The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurintricarboxylic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **55**(3): 680-688.
- Bode, L. G. M., Kluytmans, J. A. J. W., Wertheim, H. F. L., Bogaers, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Roosendaal, R., Troelstra, A., Box, A. T. A., Voss, A., van der Tweel, I., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. und Vos, M. C. (2010).** Preventing Surgical-Site Infections in Nasal Carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* **362**(1): 9-17.

- Bolstad, B., Collin, F., Brettschneider, J., Simpson, K., Cope, L., Irizarry, R. und Speed, T. (2005).** Quality Assessment of Affymetrix GeneChip Data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, R. Irizarry, S. Dudoit (Eds.) Springer, New York, 33-47, 2005.
- Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. und Speed, T. P. (2003).** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**(2): 185-193.
- Burian, M., Rautenberg, M., Kohler, T., Fritz, M., Krismer, B., Unger, C., Hoffman, W. H., Peschel, A., Wolz, C. und Goerke, C. (2010).** Temporal Expression of Adhesion Factors and Activity of Global Regulators during Establishment of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Journal of Infectious Diseases* **201**(9): 1414-1421.
- Carneiro, C. R. W., Postol, E., Nomizo, R., Reis, L. F. L. und Brentani, R. R. (2004).** Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection* **6**(6): 604-608.
- Caro, N. (1892).** *Chem Ber* **25**: 939-949.
- Casewell, M. und Hill, R. (1986).** The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.*: Suppl A:1-12.
- Casewell, M. W. und Hill, R. L. R. (1986).** Elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* with mupirocin ("pseudomonic acid") - a controlled trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **17**(3): 365-372.
- Casman, E. und Bennett, R. (1965).** Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl Microbiol.* **13**(2): 181-9.
- Catchpoole, D. und Stewart, B. (1994).** Inhibition of topoisomerase II by aurintricarboxylic acid: implications for mechanisms of apoptosis. *Anticancer Res.* **14**(3A): 853-6.
- Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M. M., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Vittori, S., Lucarini, D. und Maggi, F. (2007).** Antimicrobial Activity of Seven *Hypericum* Entities from Central Italy. *Planta Med* **73**(06): 564,566.
- Chaberny, I. F., Möller, I. und Graf, K. (2009).** Hand Hygiene and Campaigns. *Pneumologie* **63**(4): 219-221.
- Chen, Y., Bopda-Waffo, A., Basu, A., Krishnan, R., Silberstein, E., Taylor, D., Talele, T., Arora, P. und Kaushik-Basu, N. (2009).** Characterization of aurintricarboxylic acid as a potent hepatitis C virus replicase inhibitor. *Antivir Chem Chemother.* **20**(1): 19-36.
- Cheung, A., Koomey, J., Butler, C., Projan, S. und Fischetti, V. (1992).** Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**(14): 6462-6.
- Clarke, S. R., Andre, G., Walsh, E. J., Dufrene, Y. F., Foster, T. J. und Foster, S. J. (2009).** Iron-Regulated Surface Determinant Protein A Mediates Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Human Corneocyte Envelope Proteins. *Infect. Immun.* **77**(6): 2408-2416.

- Clarke, S. R., Harris, L. G., Richards, R. G. und Foster, S. J. (2002).** Analysis of Ehb, a 1.1- megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 6680 - 7.
- Clarke, S. R., Wiltshire, M. D. und Foster, S. J. (2004).** IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Molecular Microbiology* **51**(5): 1509-1519.
- Climo, M. W., Ehler, K. und Archer, G. L. (2001).** Mechanism and Suppression of Lysostaphin Resistance in Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(5): 1431-1437.
- Climo, M. W., Patron, R. L., Goldstein, B. P. und Archer, G. L. (1998).** Lysostaphin Treatment of Experimental Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Aortic Valve Endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(6): 1355-1360.
- Coates, T., Bax, R. und Coates, A. (2009).** Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**(1): 9-15.
- Cohen, P., Hudson, J. und Towers, G. (1996).** Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia*. **52**(2): 180-3.
- Cole, A. M., Tahk, S., Oren, A., Yoshioka, D., Kim, Y.-H., Park, A. und Ganz, T. (2001).** Determinants of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. **8**(6): 1064-1069.
- Patent DE69431349T2, Collins, D., Gagliardi, A. und Bhattacharyya, A. (1994).** Aurintricarbonsäurefraktionen und Analoga mit antiangiogener Aktivität und Verfahren für ihre Anwendung.
- Cookson, B. D. (1990).** Mupirocin resistance in staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**(4): 497-499.
- Corrigan, R., Mijalovic, H. und Foster, T. (2009).** Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiology* **9**(1): 22.
- Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W. und Carmeli, Y. (2003).** Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* **36**(1): 53-59.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. und Gotz, F. (1999).** The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**(10): 5427 - 5433.
- Cushman, M., Wang, P., Chang, S., Wild, C., De Clercq, E., Schols, D., Goldman, M. und Bowen, J. (1991).** Preparation and anti-HIV activities of aurintricarboxylic acid fractions and analogues: direct correlation of antiviral potency with molecular weight. *J Med Chem.* **34**(1): 329-37.
- Dassy, B., Hogan, T., Foster, T. J. und Fournier, J.-M. (1993).** Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* **139**(6): 1301-1306.
- Davis, Kepler A., Stewart, Justin J., Crouch, Helen K., Florez, Christopher E. und Hospenthal, Duane R. (2004).** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- Nares Colonization at Hospital Admission and Its Effect on Subsequent MRSA Infection. *Clinical Infectious Diseases* **39**(6): 776-782.
- Deswal, R., Singh, R., Lynn, A. M. und Frank, R. (2005).** Identification of immunodominant regions of Brassica juncea glyoxalase I as potential antitumor immunomodulation targets. *Peptides* **26**(3): 395-404.
- Diestel, R. (2010).** Biologische Charakterisierung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten unter besonderer Berücksichtigung von High-Content Analysemethoden *TU Braunschweig Dissertation*.
- Doebbeling, B. (1994).** Nasal and hand carriage of Staphylococcus aureus in healthcare workers. *J Chemother. Suppl.* **2**: 11-7.
- Downer, R., Roche, F., Park, P. W., Mecham, R. P. und Foster, T. J. (2002).** The elastin-binding protein of Staphylococcus aureus (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem* **277**: 243 - 50.
- Drew, A. E., Al-Assaad, S., Yu, V., Andrews, P., Merkel, P., Szilvassy, S., Emkey, R., Lewis, R. und Brake, R. L. (2011).** Comparison of 2 Cell-Based Phosphoprotein Assays to Support Screening and Development of an ALK Inhibitor. *Journal of Biomolecular Screening* **16**(2): 164-173.
- Dryden, M. S., Dailly, S. und Crouch, M. (2004).** A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *Journal of Hospital Infection* **56**(4): 283-286.
- Dryla, A., Gelbmann, D., Von Gabain, A. und Nagy, E. (2003).** Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Molecular Microbiology* **49**(1): 37-53.
- Ehlert, K., Schroder, W. und Labischinski, H. (1997).** Specificities of FemA and FemB for different glycine residues: FemB cannot substitute for FemA in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation. *J. Bacteriol.* **179**(23): 7573-7576.
- Elnakady, Y. A., Sasse, F., Lünsdorf, H. und Reichenbach, H. (2004).** Disorazol A1, a highly effective antimitotic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology* **67**(5): 927-935.
- Exley, R. M., Goodwin, L., Mowe, E., Shaw, J., Smith, H., Read, R. C. und Tang, C. M. (2005).** Neisseria meningitidis Lactate Permease Is Required for Nasopharyngeal Colonization. *Infect. Immun.* **73**(9): 5762-5766.
- Fields, G. B. und Noble, R. L. (1990).** Solid phase synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**: 161-214.
- Forsgren, A., Nordstrom, K., Philipson, L. und Sjoquist, J. (1971).** Protein A Mutants of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* **107**(1): 245-250.
- Foster, S. J. (1995).** Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of Staphylococcus aureus 8325/4. *J. Bacteriol.* **177**: 5723-5725.
- Frank, R. (1992).** Spot-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel chemical Synthesis on a Membrane Support. *Tetrahedron* **48**(42): 9217-9232.

- Frank, R. (2002).** The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *Journal of Immunological Methods* **267**(1): 13-26.
- P 40 27 657.9, Frank, R. und Güler, S. (1990).** Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden oder Oligonucleotiden, damit hergestelltes Flachmaterial, dessen Verwendung sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. *German patent application*.
- Frank, R., Güler, S., Krause, S. und Lindenmaier, W. (1991).** Facile and rapid "spot synthesis" of large numbers of peptides on membrane sheets. In: *Giralt, E., Andreu, D. (Eds.) Peptides 1990, Proc. 21st Eur. Peptide Symp. ESCOM, Leiden, p. 151.*
- Friedrich, A. W., Daniels-Haardt, I., Köck, R., Verhoeven, F., Mellmann, A., Harmsen, D., van Gemert-Pijnen, J. E., Becker, K. und Hendrix, M. G. R. (2008).** EUREGIO MRSA-net Twente/Münsterland – a Dutch-German cross-border network for the prevention and control of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eurosurveillance* **13**(35).
- Fursov, N., Gates, I. V., Panavas, T., Giles-Komar, J. und Powers, G. (2011).** Development and Utilization of Activated STAT3 Detection Assays for Screening a Library of Secreted Proteins. *ASSAY and Drug Development Technologies*.
- Gambarana, C., Tolu, P., Masi, F., Rinaldi, M., Giachetti, D., Morazzoni, P. und De Montis, M. (2001).** A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models. *Pharmacopsychiatry*. **34 Suppl 1**: S42-4.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M. und Irizarry, R. A. (2004).** affy - analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**(3): 307-315.
- Gentleman, R., Carey, V., Bates, D., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. und Zhang, J. (2004).** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* **5**(10): R80.
- Gentleman, R., Carey, V., Huber, W. und Hahne, F. (2011).** genefilter: Methods for Filtering Genes from Microarray Experiments. R package version 1.34.0.
- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. und Müller, R. (2003).** Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities - Past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. . *Journal of Biotechnology* **106**(2-3): 233-253.
- Geryk-Hall, M., Yang, Y. und Hughes, D. P. M. (2010).** Driven to Death: Inhibition of Farnesylation Increases Ras Activity in Osteosarcoma and Promotes Growth Arrest and Cell Death. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**(5): 1111-1119.
- Gilbart, J., Perry, C. R. und Slocombe, B. (1993).** High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: evidence for two distinct isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(1): 32-38.

- Giraud, A., Raspanti, C., Calzolari, A. und Nagel, R. (1994).** Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can J Microbiol.* **40**(8): 677-81.
- González, R., Blackburn, B. und Schleich, T. (1979).** Fractionation and structural elucidation of the active components of aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein nucleic acid interactions. *Biochim Biophys Acta* **562**(3): 534-45.
- Gould, I., MacKenzie, F., MacLennan, G., Pacitti, D., Watson, E. und Noble, D. (2007).** Topical antimicrobials in combination with admission screening and barrier precautions to control endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an Intensive Care Unit. *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**(5): 536-543.
- Grigg, J., Vermeiren, C., Heinrichs, D. und Murphy, M. (2007).** Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain. *Molecular Microbiology* **63**(1): 139-149.
- Hallick, R. B., Chelm, B. K., Gray, P. W. und Orozco, E. M. (1977).** Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Research* **4**(9): 3055-3064.
- Hamill, R. J., Vann, J. M. und Proctor, R. A. (1986).** Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for post-adherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* **54**: 833-836.
- Harris, L., Foster, S. und Richards, R. (2002).** An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater.* **31**(4): 39-60.
- Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R. B., Chhatwal, G. S., Sixma, J. J., Hartford, O. M., Foster, T. J., Peters, G., Kehrel, B. E. und Herrmann, M. (2000).** Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* **96**: 2149 - 56.
- Hashem, A. M., Flaman, A. S., Farnsworth, A., Brown, E. G., Van Domselaar, G., He, R. und Li, X. (2009).** Aurintricarboxylic Acid Is a Potent Inhibitor of Influenza A and B Virus Neuraminidases. *PLoS ONE* **4**(12): e8350.
- Heilmann, C., Hartleib, J., Hussain, M. S. und Peters, G. (2005).** The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. *Infect Immun* **73**: 4793 - 802.
- Hensen, S. M., Paviccaronicacute, M. J. A. M. P., Lohuis, J. A. C. M. und Poutrel, B. (2000).** Use of Bovine Primary Mammary Epithelial Cells for the Comparison of Adherence and Invasion Ability of *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Dairy Sci.* **83**(3): 418-429.
- Herrera, J. J. R., Cabo, M. L., Gonzalez, A., Pazos, I. und Pastoriza, L. (2007).** Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology* **24**(6): 585-591.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. und Kobayashi, I. (1997).** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**(9092): 1670-3.
- Hoefnagels-Schuermans, A., Peetermans, W. E., Jorissen, M., Van Lierde, S., Van den Oord, J., De Vos, R. und Van Eldere, J. (1999).** *Staphylococcus aureus* adherence

- to nasal epithelial cells in a physiological in vitro model. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* **35**: 472-80.
- Höfle, G. (2009).** The epothilones: an outstanding family of anti-tumor agents. General aspects. *Fortschr Chem Org Naturst.* **90**: 5-28.
- Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K. und Reichenbach, H. (1996).** Epothilon A und B - neuartige, 16gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung. *Angew. Chem.* **108**: 1671-1673.
- Höfle, G. und Röser, K. (1978).** Structure of Xanthomegnin and Related Pigments : Reinvestigation by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J.C.S. Chem comm.*(611-612).
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R. und Steinert, P. M. (1991).** Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem.* **266**(10): 6626-36.
- Holden, W. E., Wilkins, J. P., Harris, M., Milczuk, H. A. und Giraud, G. D. (1999).** Temperature conditioning of nasal air: effects of vasoactive agents and involvement of nitric oxide. *J Appl Physiol* **87**(4): 1260-1265.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. und Lempicki, R. A. (2008).** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protocols* **4**(1): 44-57.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. und Lempicki, R. A. (2009).** Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* **37**(1): 1-13.
- Huesca, M., Peralta, R., Sauder, D. N., Simor, A. E. und McGavin, M. J. (2002).** Adhesion and Virulence Properties of Epidemic Canadian Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain 1: Identification of Novel Adhesion Functions Associated with Plasmin-Sensitive Surface Protein. *Journal of Infectious Diseases* **185**(9): 1285-1296.
- Hughes, J. und Mellows, G. (1980).** Interaction of pseudomonic acid A with Escherichia coli B isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochem J.* **191**(1): 209-19.
- Hung, H.-C., Tseng, C.-P., Yang, J.-M., Ju, Y.-W., Tseng, S.-N., Chen, Y.-F., Chao, Y.-S., Hsieh, H.-P., Shih, S.-R. und Hsu, J. T. A. (2009).** Aurintricarboxylic acid inhibits influenza virus neuraminidase. *Antiviral Research* **81**(2): 123-131.
- Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G. und Herrmann, M. (2001).** Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of Staphylococcus aureus with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* **183**: 6778 - 86.
- Hussain, M., Hagggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J. I. und Herrmann, M. (2002).** Insertional inactivation of Eap in Staphylococcus aureus strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun* **70**: 2933-2940.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. und Speed, T. P. (2003).** Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**(2): 249-264.



- Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G. und Reichenbach, H. (1995).** Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. *J Antibiot (Tokyo)* **48**(1): 31-5.
- Istrate, M. A., Spicer, T. P., Wang, Y., Bernard, J. A., Helvering, L. M., Bocchinfuso, W. P., Richardson, T. I., Zink, R., Kumar, N., Montrose-Rafizadeh, C., Dodge, J., Hodder, P. und Griffin, P. R. (2011).** Development of an HTS-Compatible Assay for Discovery of RORalpha Modulators Using AlphaScreen® Technology. *Journal of Biomolecular Screening* **16**(2): 183-191.
- Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K. E. und Platt, N. (2006).** Identification and Characterization of Murine SCARA5, a Novel Class A Scavenger Receptor That Is Expressed by Populations of Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **281**(17): 11834-11845.
- Jones, C. L. und Khan, S. A. (1986).** Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **166**(1): 29-33.
- Jonsson, I.-M., Mazmanian, S. K., Schneewind, O., Verdrengh, M., Bremell, T. und Tarkowski, A. (2002).** On the Role of *Staphylococcus aureus* Sortase and Sortase-Catalyzed Surface Protein Anchoring in Murine Septic Arthritis. *Journal of Infectious Diseases* **185**(10): 1417-1424.
- Jonsson, P., Lindberg, M., Haraldsson, I. und Wadstrom, T. (1985).** Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect. Immun.* **49**(3): 765-769.
- Josefsson, E., McCrea, K. W., Ni Eidhin, D., O'Connell, D., Cox, J., Hook, M. und Foster, T. J. (1998).** Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **144**: 3387 - 95.
- Karioti, A. und Bilia, A. R. (2010).** Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *Int J Mol Sci.* **11**(2): 562-94.
- Kim, D. H., Spencer, M., Davidson, S. M., Li, L., Shaw, J. D., Gulczynski, D., Hunter, D. J., Martha, J. F., Miley, G. B., Parazin, S. J., Dejoie, P. und Richmond, J. C. (2010).** Institutional Prescreening for Detection and Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Patients Undergoing Elective Orthopaedic Surgery. *J Bone Joint Surg Am* **92**(9): 1820-1826.
- Kinsman, O. S., McKenna, R. und Noble, W. C. (1983).** Association between histocompatibility antigens (HLA) and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **16**(2): 215-220.
- Klein, P., Cirioni, O., Giacometti, A. und Scalise, G. (2008).** In vitro and in vivo activity of aurintricarboxylic acid preparations against *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**(5): 1101-1104.
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Tenover, F. C., McDonald, L. C., Horan, T., Gaynes, R. und National Nosocomial Infections Surveillance, S. (2006).** Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003. *Clinical Infectious Diseases* **42**(3): 389-391.
- Kluytmans, J., van Belkum, A. und Verbrugh, H. (1997).** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* **10**: 505 - 20.

- Knausz, M., Kaproncai, G. und Rozgonyi, F. (2010).** Cost/benefit calculations of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening methods and their practical importance. *Orvosi Hetilap* **151**(22): 893-898.
- Knodler, L. A., Bestor, A., Ma, C., Hansen-Wester, I., Hensel, M., Vallance, B. A. und Steele-Mortimer, O. (2005).** Cloning Vectors and Fluorescent Proteins Can Significantly Inhibit *Salmonella enterica* Virulence in Both Epithelial Cells and Macrophages: Implications for Bacterial Pathogenesis Studies. *Infect. Immun.* **73**(10): 7027-7031.
- Kokai-Kun, J. (2008).** The Cotton Rat as a Model for *Staphylococcus aureus* nasal colonization in humans: cotton rat *S. aureus* nasal colonization model. *Methods Mol Biol.* **431**: 241-54.
- Kokai-Kun, J. F., Walsh, S. M., Chanturiya, T. und Mond, J. J. (2003).** Lysostaphin Cream Eradicates *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in a Cotton Rat Model. **47**(5): 1589-1597.
- Kreikemeyer, B., McDevitt, D. und Podbielski, A. (2002).** The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int J Med Microbiol* **292**: 283–295.
- Krohn, K., Kouam, S. F., Kuigoua, G. M., Hussain, H., Cludius-Brandt, S., Flörke, U., Kurtán, T., Pescitelli, G., Di Bari, L., Draeger, S. und Schulz, B. (2009).** Xanthones and Oxepino [2, 3-b]chromones from Three Endophytic Fungi. *Chem. Eur. J.* **15**: 12121 – 12132.
- Kügler, J., Nieswandt, S., Gerlach, G., Meens, J., Schirrmann, T. und Hust, M. (2008).** Identification of immunogenic polypeptides from a *Mycoplasma hyopneumoniae* genome library by phage display. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**(3): 447-458.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. und Hiramatsu, K. (2003).** Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **49**(3): 807-821.
- Lavie, G., Mazur, Y., Lavie, D., Prince, A., Pascual, D., Liebes, L., Levin, B. und Meruelo, D. (1995).** Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion.* **35**(5): 392-400.
- Lee, Bruce Y., Wiringa, Ann E., Bailey, Rachel R., Goyal, V., Tsui, B., Lewis, G. J., Muder, Robert R. und Harrison, Lee M. (2010).** The Economic Effect of Screening Orthopedic Surgery Patients Preoperatively for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **31**(11): 1130-1138.
- Lee, J.-H., Shim, J. S., Chung, M.-S., Lim, S.-T. und Kim, K. H. (2009).** In vitro anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytotherapy Research* **23**(4): 460-466.
- Lee, J., Betley, M., Hopkins, C., Perez, N. und Pier, G. (1987).** Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. *J Infect Dis* **156**(5): 741-50.

- Leuner, K., Kazanski, V., Müller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C. und Müller, W. E. (2007).** Hyperforin - a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal* **21**(14): 4101-4111.
- Liang, F., Huang, Z., Lee, S.-Y., Liang, J., Ivanov, M. I., Alonso, A., Bliska, J. B., Lawrence, D. S., Mustelin, T. und Zhang, Z.-Y. (2003 ).** Aurintricarboxylic Acid Blocks in Vitro and in Vivo Activity of YopH, an Essential Virulent Factor of *Yersinia pestis*, the Agent of Plague *J. Biol. Chem.* **278**: : 41734-41741.
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D. und Ji, Y. (2006).** Inactivation of a Two-Component Signal Transduction System, SaeRS, Eliminates Adherence and Attenuates Virulence of *Staphylococcus aureus*. **74**(8): 4655-4665.
- Lillehoj, E. P., Hyun, S. W., Kim, B. T., Zhang, X. G., Lee, D. I., Rowland, S. und Kim, K. C. (2001).** Muc1 mucins on the cell surface are adhesion sites for *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **280**(1): L181-L187.
- Liu, G., Marrinan, C. H., Taylor, S. A., Black, S., Basso, A. D., Kirschmeier, P., Robert Bishop, W., Liu, M. und Long, B. J. (2007).** Enhancement of the antitumor activity of tamoxifen and anastrozole by the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib (SCH66336). *Anti-Cancer Drugs* **18**(8): 923-931 e.
- Liu, G. Y., Essex, A., Buchanan, J. T., Datta, V., Hoffman, H. M., Bastian, J. F., Fierer, J. und Nizet, V. (2005).** *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine* **202**(2): 209-215.
- Longin, A., Souchier, C., Ffrench, M. und Bryon, P. A. (1993).** Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **41**(12): 1833-40.
- Lundholt, B. K., Scudder, K. M. und Pagliaro, L. (2003).** A Simple Technique for Reducing Edge Effect in Cell-Based Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **8**(5): 566-570.
- Luong, T., Sau, S., Gomez, M., Lee, J. C. und Lee, C. Y. (2002).** Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Expression by agr and sarA. *Infect. Immun.* **70**(2): 444-450.
- Luzar, M. A., Coles, G. A., Faller, B., Slingeneyer, A., Dah, G. D., Briat, C., Wone, C., Knefati, Y., Kessler, M. und Peluso, F. (1990).** *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage and Infection in Patients on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *New England Journal of Medicine* **322**(8): 505-509.
- Mamo, W., Bodén, M. und Flock, J.-I. (1994).** Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonization of *S. aureus* in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**: 47-54.
- Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 202-18.
- Marraffini, L. A., DeDent, A. C. und Schneewind, O. (2006).** Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(1): 192-221.

- Mauri, P. und Pietta, P. (2000).** High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **14**(2): 95-99.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E. und Schneewind, O. (2000).** *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(10): 5510-5515.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H. und Schneewind, O. (1999).** *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **285**: 760 - 3.
- Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M. und Schneewind, O. (2003).** Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**: 906 - 9.
- Mempel, M., Schmidt, T., Weidinger, S., Schnopp, C., Foster, T., Ring, J. und Abeck, D. (1998).** Role of *Staphylococcus aureus* surface-associated proteins in the attachment to cultured HaCaT keratinocytes in a new adhesion assay. *Journal of Investigative Dermatology* **111**(3): 452-456.
- Patent U.S.4880788, Moake, J. L., Phillips, M. D., McIntire, L. V. und Hellums, J. D. (1989).** Method for preventing and treating thrombosis.
- Moore, K. und Rees, S. (2001).** Cell-Based Versus Isolated Target Screening: How Lucky Do You Feel? *Journal of Biomolecular Screening* **6**(2): 69-74.
- Nakane, H., Balzarini, J., de Clercq, E. und Ono, K. (1988).** Differential inhibition of various deoxyribonucleic acid polymerases by Evans blue and aurintricarboxylic acid. *European Journal of Biochemistry* **177**(1): 91-96.
- Nicholson, T. L., Buboltz, A. M., Harvill, E. T. und Brockmeier, S. L. (2009).** Microarray and Functional Analysis of Growth Phase-Dependent Gene Regulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* **77**(10): 4221-4231.
- O'Brien, L., Kerrigan, S. W., Kaw, G., Hogan, M., Penades, J., Litt, D., Fitzgerald, D. J., Foster, T. J. und Cox, D. (2002).** Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* **44**(4): 1033 - 1044.
- O'Brien, L. M., Walsh, E. J., Massey, R. C., Peacock, S. J. und Foster, T. J. (2002).** *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. **4**(11): 759-770.
- O'Riordan, K. und Lee, J. C. (2004).** *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(1): 218-234.
- Okada, N. und Koizumi, S. (1995).** A Neuroprotective Compound, Aurin Tricarboxylic Acid, Stimulates the Tyrosine Phosphorylation Cascade in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**(27): 16464-16469.
- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y. M., Suginaka, H. und Tomasz, A. (1995).** A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine

- amidase domain and an endo-b-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 285–289.
- Osterloh, F. (2011).** Infektionsschutzänderungsgesetz: Hygienepflicht in Klinik und Praxis. *Deutsches Ärzteblatt* **108**(25).
- Palma, M., Hagggar, A. und Flock, J.-I. (1999).** Adherence of *Staphylococcus aureus* Is Enhanced by an Endogenous Secreted Protein with Broad Binding Activity. *J. Bacteriol.* **181**(9): 2840-2845.
- Palma, M., S. , Nozohoor, S., Schenning, T., Heimdahl, A. und Flock, J. I. (1996).** Lack of the extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases virulence in experimental wound infection. *Infect. Immun.* **64**: 5284-5289.
- Panlilio, A. L., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Banerjee, S., Henderson, T. S., Tolson, J. S. und Martone, W. J. (1992).** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. Hospitals, 1975-1991. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **13**(10): 582-586.
- Papanikou, E., Karamanou, S. und Economou, A. (2007).** Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Micro* **5**(11): 839-851.
- Patel, A. H., Nowlan, P., Weavers, E. D. und Foster, T. (1987).** Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect. Immun.* **55**(12): 3103-3110.
- Peacock, S. J., Day, N. P., Thomas, M. G., Berendt, A. R. und Foster, T. J. (2000).** Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect* **41**(1): 23 - 31.
- Peacock, S. J., de Silva, I. und Lowy, F. D. (2001).** What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends in Microbiology* **9**(12): 605-610.
- Phillips, M. D., Moake, J. L., Nolasco, L. und Turner, N. (1988).** Aurin tricarboxylic acid: a novel inhibitor of the association of von Willebrand factor and platelets. *Blood* **72**(6): 1898-1903.
- Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K. B., Döring, G., Lee, J. C., Fournier, J.-M., Botzenhart, K. und Wolz, C. (2000).** Adherence of *Staphylococcus aureus* to Endothelial Cells: Influence of Capsular Polysaccharide, Global Regulator *agr*, and Bacterial Growth Phase. *Infect. Immun.* **68**(9): 4865-4871.
- Poutaraud, A., Di Gregorio, F. o., Tin, V. C. F. und Girardin, P. (2001).** Effect of Light on Hypericins Contents in Fresh Flowering Top Parts and in an Extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med* **67**(03): 254,259.
- Poutrel, B., Gilbert, F. B. und Lebrun, M. (1995).** Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**(2): 166-171.
- Qoronfleh, M. W., Hesterberg, L. K. und Seefeldt, M. B. (2007).** Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. *Protein Expression and Purification* **55**(2): 209-224.
- Reagan, D., Doebbeling, B., Pfaller, M., Sheetz, C., Houston, A., Hollis, R. und Wenzel, R. (1991).** Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage

- with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Ann Intern Med.* **114**(2): 101-6.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. und Novick, R. (1986).** Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agr. *Mol Gen Genet.* **202**(1): 58-61.
- Reichling, J., Weseler, A. und Saller, R. (2001).** A Current Review of the Antimicrobial Activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* **34**(Sup. 1): 116,118.
- Rep, M. M. M. W. (1997).** Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin--Japan, 1996. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC).* **46**(27): 624-6.
- Roche, F. M., Meehan, M. und Foster, T. J. (2003).** The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* **149**(Pt 10): 2759 - 2767.
- Saravia-Otten, P., Muller, H. P. und Arvidson, S. (1997).** Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *J. Bacteriol.* **179**(17): 5259-5263.
- Schaffer, A. C., Solinga, R. M., Cocchiaro, J., Portoles, M., Kiser, K. B., Risley, A., Randall, S. M., Valtulina, V., Speziale, P., Walsh, E., Foster, T. und Lee, J. C. (2006).** Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infection and Immunity* **74**(4): 2145-2153.
- Schempp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, E. und Simon, J. C. (1999).** Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet* **353**(9170): 2129-2129.
- Seefeldt, M., Rosendahl, M., Cleland, J. und Hesterberg, L. (2009).** Application of high hydrostatic pressure to dissociate aggregates and refold proteins. *Curr Pharm Biotechnol.* **10**(4): 447-55.
- Shalon, D., Smith, S. J. und Brown, P. O. (1996).** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* **6**(7): 639-645.
- Shi, L., Ardehali, R., Caldwell, K. D. und Valint, P. (2000).** Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **17**(4): 229-239.
- Shun, T. Y., Lazo, J. S., Sharlow, E. R. und Johnston, P. A. (2010).** Identifying Actives from HTS Data Sets: Practical Approaches for the Selection of an Appropriate HTS Data-Processing Method and Quality Control Review. *Journal of Biomolecular Screening.*
- Shuter, J., Hatcher, V. B. und Lowy, F. D. (1996).** *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infection and Immunity* **64**(1): 310-8.
- Sibbald, M. J. J. B., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., de Jong, A., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Stokroos, I., Arends, J. P., Dubois, J. Y. F. und van Dijk, J. M. (2006).** Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. *70*(3): 755-788.

- Siboo, I. R., Chambers, H. F. und Sullam, P. M. (2005).** Role of SraP, a Serine-Rich Surface Protein of *Staphylococcus aureus*, in Binding to Human Platelets. *Infect. Immun.* **73**(4): 2273-2280.
- Skaar, E. P., Gaspar, A. H. und Schneewind, O. (2004).** IsdG and IsdI, Heme-degrading Enzymes in the Cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(1): 436-443.
- Smeltzer, M. S., Gill, S. R. und Iandolo, J. J. (1992).** Localization of a chromosomal mutation affecting expression of extracellular lipase in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **174**(12): 4000-4006.
- Smith, C., Kaper, J. und Mack, D. (1995).** Intestinal mucin inhibits adhesion of human enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **3**: 269-76.
- Smyth, G. K. (2004).** Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article 3.
- Smyth, G. K. (2005).** Limma: linear models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.) Springer, New York, 397-420, 2005.
- Solzbacher, D., Hanisch, F.-G., van Alphen, L., Gilsdorf, J. und Schroten, H. (2003).** Mucin in middle ear effusions inhibits attachment of *Haemophilus influenzae* to mucosal epithelial cells. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **260**(3): 141-147.
- Soto, G. E. und Hultgren, S. J. (1999).** Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.* **181**(4): 1059-1071.
- Soutullo, A., Santi, M. N., Perin, J. C., Beltramini, L. M., Borel, I. M., Frank, R. und Tonarelli, G. G. (2007).** Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. *Journal of Molecular Recognition* **20**(4): 227-237.
- Spelman, K., Aldag, R., Hamman, A., Kwasnik, E. M., Mahendra, M. A., Obasi, T. M., Morse, J. und Williams, E. J. (2011).** Traditional herbal remedies that influence cell adhesion molecule activity. *Phytotherapy Research* **25**: 473-483.
- Steinert, P. und Marekov, L. (1997).** Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem.* **272**(3): 2021-30.
- Stranden, A. M., Ehlert, K., Labischinski, H. und Berger-Bachi, B. (1997).** Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**(1): 9-16.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S. und Mesirov, J. P. (2005).** Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(43): 15545-15550.
- Takiguchi, Y., Shimazawa, M. und Nakashima, M. (1996).** A comparative study of the antithrombotic effect of aurointricarboxylic acid on arterial thrombosis in rats and guinea pigs. *Br J Pharmacol.* **118**(7): 1633-1638.

- Taylor, J. M. und Heinrichs, D. E. (2002).** Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol. Microbiol.* **43**: 1603–1614.
- Tegge, W. (2008).** Entwicklung und Etablierung eines hochdurchsatzfähigen Testsystems für bakterielles Wachstum und Biofilmbildung und dessen Einsatz in der Untersuchung von Peptiden, Sekundärmetaboliten sowie einer chemisch-synthetischen Substanzsammlung. *Medizinische Hochschule Hannover Dissertation*.
- Thompson, D. und Reed, M. (1995).** Inhibition of NAD(H)/NADP(H)--requiring enzymes by aurintricarboxylic acid. *Toxicol Lett.* **81**(2-3): 141-9.
- Thornalley, P. (1990).** The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J.* **269**(1): 1-11.
- van Belkum, A., Emonts, M., Wertheim, H., de Jongh, C., Nouwen, J., Bartels, H., Cole, A., Cole, A., Hermans, P., Boelens, H., Toom, N. L.-d., Snijders, S., Verbrugh, H. und van Leeuwen, W. (2007).** The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection* **9**(12-13): 1471-1477.
- van Belkum, A., Kools-Sijmons, M. und Verbrugh, H. (2002).** Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. *Journal of Microbiological Methods* **48**(1): 19-42.
- van Rijen, M. und Kluytmans, J. (2009).** Costs and benefits of the MRSA Search and Destroy policy in a Dutch hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **28**(10): 1245-1252.
- van Wamel, W. J. B., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Verhoef, J. und Fluit, A. C. (1998).** The effect of culture conditions on the in-vitro adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **47**(8): 705-709.
- van Wely, K. H. M., Swaving, J., Freudl, R. und Driessen, A. J. M. (2001).** Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**(4): 437-454.
- VanderWerf, Q., Saxton, R., Chang, A., Horton, D., Paiva, M., Anderson, J., Foote, C., Soudant, J., Mathey, A. und Castro, D. (1996).** Hypericin: a new laser phototargeting agent for human cancer cells. *Laryngoscope.* **106**(4): 479-83.
- Vermeiren, C. L., Pluym, M., Mack, J., Heinrichs, D. E. und Stillman, M. J. (2006).** Characterization of the heme binding properties of *Staphylococcus aureus* IsdA. *Biochemistry* **45**: 12867–12875.
- Villareal, V. A., Pilpa, R. M., Robson, S. A., Fadeev, E. A. und Clubb, R. T. (2008).** The IsdC Protein from *Staphylococcus aureus* Uses a Flexible Binding Pocket to Capture Heme. *Journal of Biological Chemistry* **283**(46): 31591-31600.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. und Peters, G. (2001).** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* **344**(1): 11 - 16.
- Walsh, E. J., O'Brien, L. M., Liang, X., Hook, M. und Foster, T. J. (2004).** Clumping Factor B, a Fibrinogen-binding MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing



- Adhesive Matrix Molecules) Adhesin of *Staphylococcus aureus*, Also Binds to the Tail Region of Type I Cytokeratin 10. **279**(49): 50691-50699.
- Wang, P., Kozlowski, J. und Cushman, M. (1992).** Isolation and Structure Elucidation of Low Molecular Weight Components of Aurintricarboxylic Acid (ATA) *J. Org. Chem.* **57**: 3861-3866.
- Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J. F., Kristian, S. A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J. J. und Peschel, A. (2004).** Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine* **10**(3): 243-5.
- Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J. F., Kulauzovic, E., Kohler, T., Thumm, G., Stoll, H., Götz, F. und Peschel, A. (2008).** Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *International Journal of Medical Microbiology* **298**(5-6): 505-513.
- Wertheim, H. F., Vos, M. C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J. A., van Keulen, P. H., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Meester, M. H. und Verbrugh, H. A. (2004).** Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* **364**(9435): 703 - 705.
- Wertheim, H. F. L., Walsh, E., Choudhury, R., Melles, D. C., Boelens, H. I. n. A. M., Mijalovic, H., Verbrugh, H. A., Foster, T. und van Belkum, A. (2008).** Key Role for Clumping Factor B in *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization of Humans. *PLoS Med* **5**(1): e17.
- Wirz, A., Meier, B. und Sticher, O. (2001).** Stability of hypericin and pseudohypericin in extract solutions of *Hypericum perforatum* and in standard solutions. *Pharmazeutische Industrie* **63**(4): 410-415.
- Wunder, F., Kalthof, B., Müller, T. und Hüser, J. (2008).** Functional cell-based assays in microliter volumes for ultra-high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen.* **7**: 495-504.
- Yamaguchi, K. und Ohno, A. (1992).** Considerations on MRSA infections in relation to modern chemotherapy. *Nippon Rinsho* **50**(5): 923-21.
- Yu, V. L., Goetz, A., Wagener, M., Smith, P. B., Rihs, J. D., Hanchett, J. und Zuravleff, J. J. (1986).** *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage and Infection in Patients on Hemodialysis. *New England Journal of Medicine* **315**(2): 91-96.
- Zeeck, A., Ruß, P., Laatsch, H., Loeffler, W., Wehrle, H., Zähler, H. und Holst, H. (1979).** Isolierung des Antibiotikums semi-Vioxanthin aus *Penicillium citreo-viride* und Synthese des Xanthomegnins *Chem. Ber.* **112**: 957-978.
- Zheng, C. J., Han, L. Y., Yap, C. W., Ji, Z. L., Cao, Z. W. und Chen, Y. Z. (2006).** Therapeutic Targets: Progress of Their Exploration and Investigation of Their Characteristics. *Pharmacological Reviews* **58**(2): 259-279.
- Zylka-Menhorn, V. (2010).** Krankenhaushygiene: Netzwerke können mehr bewirken als neue Gesetze. *Deutsches Ärzteblatt* **107**(36).

## Internetadressen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.affymetrix.com>

<http://www.uniprot.org>

<http://www.kegg.com>

[http://www.wip.nl/UK/free\\_content/Richtlijnen/MRSA%20hospital.pdf](http://www.wip.nl/UK/free_content/Richtlijnen/MRSA%20hospital.pdf)

<http://www.rki.de>

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
Abbildung 1-2: Zellschichten menschlicher Epidermis (Quelle Wikipedia: frei verfügbar).....	8
Abbildung 1-3: MRSA-Rate in Europa, 2009 .....	12
Abbildung 1-4: Pipettierroboter Evolution P3 von Perkin Elmer .....	14
Abbildung 1-5: Automatisches Mikroskop ImageXpress Micro (IXM) von Molecular Devices .....	14
Abbildung 1-6: Peptid-SPOT-Synthese auf Cellulosemembranen (Frank, 2002) .....	17
Abbildung 1-7: Schematische Darstellung eines Antikörper-Bindungsassays unter Einsatz von Peptid-SPOT-Membranen (Frank, 1992) .....	18
Abbildung 3-1: Adhäsion von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit der Wachstumsphase .....	50
Abbildung 3-2: Färbung der Bakterien mit Syto 9 .....	52
Abbildung 3-3: Anzahl und Position der Bilder innerhalb eines Wells (96-Well-Format).....	54
Abbildung 3-4: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 an A-549, aufgenommen und analysiert mit dem IXM und der Software MetaXpress .....	55
Abbildung 3-5: Übersicht des Ablaufschemas des etablierten Assays .....	56
Abbildung 3-6: Adhäsion von <i>S. aureus</i> SA113 (links) und <i>S. aureus</i> SA113 $\Delta tagO$ (rechts) im Vergleich .....	58
Abbildung 3-7: Adhäsion des Wildtyps <i>S. aureus</i> SA113 im Vergleich zur Adhäsion der Mutante <i>S. aureus</i> SA113 $\Delta tagO$ .....	59
Abbildung 3-8: Überblick über die Gleichmäßigkeit der Werte eines Adhäsionsassays, dessen Ergebnis mit Hilfe des IXM und MetaXpress erfasst wurde .....	60
Abbildung 3-9: Ergebnis der Quantifizierung nach Durchführung des Internalisierungsassays .....	60
Abbildung 3-10: Hits der Lopac-Sammlung .....	62
Abbildung 3-11: Hits der Var-Sammlung .....	63
Abbildung 3-12: Untersuchung der Aktivitäten der Hit-Substanzen .....	64
Abbildung 3-13: Pseudohypericin (A) und Hypericin (B) .....	69
Abbildung 3-14: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 unter Inkubation mit Hypericin .....	69
Abbildung 3-15: Aktivitätsmessung von Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin .....	70
Abbildung 3-16: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 unter Inkubation mit ATA (A) bzw. PSH (B) .....	71
Abbildung 3-17: Wirkung von ATA auf mit <i>S. aureus</i> besiedelte A-549-Zellen .....	72
Abbildung 3-18: Wirkung von PSH auf mit <i>S. aureus</i> besiedelte A-549-Zellen .....	72
Abbildung 3-19: Vitalitätstests mit Aurintricarbonsäure und Pseudohypericin .....	73
Abbildung 3-20: Adhäsion der einzelnen <i>S. aureus</i> Stämme ohne Substanz .....	75

Abbildung 3-21: Adhäsion verschiedener <i>S. aureus</i> -Isolate bzw. -Mutanten unter Inkubation mit ATA und PSH.....	75
Abbildung 3-22: Einfluss einer ü. N. Vorinkubationszeit der Wirksubstanzen mit den Epithelzellen auf die Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 .....	76
Abbildung 3-23: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 an HNEPC unter Inkubation mit ATA .....	77
Abbildung 3-24: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 an HNEPC unter Inkubation mit 51 µM Pseudohypericin (V1 und V2) bzw. mit DMSO (Kontrolle=K).....	77
Abbildung 3-25: Wirkung von ATA und PSH auf die Adhäsion von <i>S. aureus</i> SA113 $\Delta$ <i>srtA</i> .....	78
Abbildung 3-26: Einige Strukturen von ATA (Wang <i>et al.</i> , 1992).....	79
Abbildung 3-27: HPLC-Lauf von ATA .....	80
Abbildung 3-28: Adhäsionsinhibierende Wirkung einzelner ausgewählter, aufgereinigter Fraktionen von ATA auf <i>S. aureus</i> N315 .....	81
Abbildung 3-29: Strukturen der drei in dieser Arbeit identifizierten adhäsionsinhibierenden Substanzen.....	81
Abbildung 3-30: Adhäsionsinhibierende Wirkung von Poly(I).....	82
Abbildung 3-31: Synthetisierte Peptide zur Identifizierung wirkungsrelevanter adhäsionsinhibierender Strukturelemente von ATA, A und B: siehe Text ....	82
Abbildung 3-32: Struktur von Aurin .....	83
Abbildung 3-33: Substanzen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Pseudohypericin und HZI10676D08.....	83
Abbildung 3-34: Herstellung der rekombinanten Proteine .....	86
Abbildung 3-35: Peptide der SPOT-Membran aus der N-terminalen Sequenz von Cytokeratin 10 .....	86
Abbildung 3-36: SPOT-Membranen, die mit einem Anti-His- und anschließend mit einem AP-konjugiertem AK inkubiert wurden .....	88
Abbildung 3-37: CD-Spektroskopie der rekombinanten Proteine .....	90
Abbildung 3-38: A-549-Zellen inkubiert mit <i>rlsA</i> (links) und ohne rekombinantes Protein (rechts).....	90
Abbildung 3-39: Elektropherogramm zur Qualitätsanalyse aufgereinigter RNA, erstellt nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung mit dem Agilent Bioanalyzer-2100 .....	92
Abbildung 3-40: RLE-Plots (relative logarithmische Expression) .....	93
Abbildung 3-41: NUSE-Plots ( <i>Normalized Unscaled Standard Error</i> ) .....	94
Abbildung 3-42: log2 Expressionswerte nach RMA ( <i>Robust Multi-array Averaging</i> ) .....	94
Abbildung 3-43: Hierarchische Clusteranalyse der 47 ausgewählten Adhäsionsgene sowie der zehn Bedingungen. ....	100
Abbildung 3-44: Hierarchische Clusteranalyse der zehn Versuchsbedingungen, basierend auf allen <i>Probe Sets</i> der GeneChips® .....	101
Abbildung 3-45: In ANM5h im Vergleich zu BHI2h hoch- bzw. runterregulierte Adhäsionsgene .....	102
Abbildung 3-46: Ergebnisse der Anreicherungs-Analysen ANM5h vs. BHI2h .....	103

Abbildung 3-47: In ANM8h im Vergleich zu BHI4h hoch- bzw. runterregulierte Adhäsionsgene .....	104
Abbildung 3-48: Ergebnisse der Anreicherungs-Analysen ANM8h vs. BHI4h .....	105
Abbildung 4-1: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 an die Epithelzellen A-549 .....	110
Abbildung 4-2: Adhäsion von <i>S. aureus</i> N315 an HNEPC .....	111
Abbildung 4-3: Strukturen von Anthracen (A), Anthrachinon (B) und Anthron (C) .....	116
Abbildung 4-4: Struktur von Polyinosinsäure .....	116

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung, Hersteller und Firmensitz .....	21
Tabelle 2-2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Lieferanten mit Firmensitz .....	23
Tabelle 2-3: Kits unter Angabe des Lieferanten (bzw. der Bezugsquelle) mit Firmensitz .....	23
Tabelle 2-4: Antikörper bzw. Farbstoff mit Lieferant.....	24
Tabelle 2-5: Medien für die Kultivierung von <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i> .....	25
Tabelle 2-6: Zellkulturmedien mit Firma und zugegebenen Komponenten.....	25
Tabelle 2-7: Puffer und Lösungen .....	25
Tabelle 2-8: Zelllinien .....	26
Tabelle 2-9: <i>S. aureus</i> -Stämme.....	27
Tabelle 2-10: Peptidbibliotheken .....	28
Tabelle 2-11: Primer .....	28
Tabelle 2-12: Enzyme.....	29
Tabelle 2-13: Software .....	29
Tabelle 2-14: PCR-Programm .....	39
Tabelle 2-15: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	41
Tabelle 3-1: Substanzen, die erneut bezogen keine signifikante Aktivität zeigten.....	65
Tabelle 3-2: Substanzen mit antibakterieller Wirkung gegen <i>S. aureus</i> N315.....	66
Tabelle 3-3: Substanzen, die zu Ablösungen der A-549-Zellen vom MTP-Boden führten .....	68
Tabelle 3-4: Substanzen, die nicht erneut bezogen werden konnten .....	68
Tabelle 3-5: Substanzkandidaten .....	68
Tabelle 3-6: IC <sub>10</sub> -, IC <sub>50</sub> - und IC <sub>90</sub> -Werte der zwei Wirkstoffkandidaten .....	71
Tabelle 3-7: Gewählte Versuchsbedingungen zur Transkriptom-Analyse .....	91
Tabelle 3-8: Adhäsionsgene, die bei Dateninterpretation gesondert fokussiert wurden .....	95

## 7.3 Peptidsequenzen

- basierend auf den Sequenzen der nativen humanen Proteine

- synthetisiert auf Cellulosemembranen

### Membran 1:

;Cytocsc1 Peptide  
.pep

MSVRYSSSKHYSSSR	GGDGGLLSGNEKVTM	TEELAYLKKNHEEEM
RYSSSKHYSSSRSGG	GGLLSGNEKVTMQNL	LAYLKKNHEEEMKDL
SSKHYSSSRSGGGGG	LSGNEKVTMQNLNDR	LKKNHHEEEMKDLRNV
HYSSSRSGGGGGGGG	NEKVTMQNLNDRLAS	NHEEEMKDLRNVSTG
SSRSGGGGGGGGCGG	VTMQNLNDRLASYLD	EEMKDLRNVSTGDVN
SGGGGGGGGCGGGGG	QNLNDRLASYLDKVR	KDLRNVSTGDVNVEM
GGGGGGCGGGGGVSS	NDRLASYLDKVRALE	RNVSTGDVNVEMNAA
GGGCGGGGGVSSLRI	LASYLDKVRALEESN	STGDVNVEMNAAPGV
CGGGGGVSSLRISSS	YLDKVRALEESNYEL	DVNVEMNAAPGVDLT
GGGVSSLRISSSKGS	KVRALEESNYELEGGK	VEMNAAPGVDLTQLL
VSSLRISSSKGSLGG	ALEESNYELEGGIKE	NAAPGVDLTQLLNM
LRISSSKGS LGGFS	ESNYELEGGIKEWYE	PGVDLTQLLNMRSQ
SSSKGSLGGGFSSGG	YELEGGIKEWYEHG	DLTQLLNMRSQYEQ
KGSLGGGFSSGGFSG	EGKIKEWYEHGNSH	QLLNMRSQYEQLAE
LGGGFSSGGFSSGGSF	IKEWYEHGNSHQGE	NNMRSQYEQLAEQNR
GFSSGGFSSGGSFSG	WYEHGNSHQGEPRD	RSQYEQLAEQNRKDA
SGGSFSSGGSFSSRG	KHGNSHQGEPRDYSK	YEQLAEQNRKDAEAW
FSSGSFSSGGSFGG	NSHQGEPRDYSKYK	LAEQNRKDAEAWFNE
GSFSRGSSGGGCFGG	QGEPRDYSKYKTID	QNRKDAEAWFNEKSK
SRGSSGGGCFGGSSG	PRDYSKYKTIDDLK	KDAEAWFNEKSKELT
SSGGGCFGGSSGGYG	YSKYKTIDDLKNQI	EAWFNEKSKELTTEI
GGCFGGSSGGYGGLG	YYKTIDDLKNQILNL	FNEKSKELTTEIDNN
FGGSSGGYGGLGGFG	TIDDLKNQILNLTTD	KSKELTTEIDNNIEQ
SSGGYGGLGGFGGGS	DLKNQILNLTTDNAN	ELTTEIDNNIEQISS
YGGLGGFGGGSFRG	NQILNLTTDNANILL	TEIDNNIEQISSYKS
GLGGFGGGSFRGSYG	LNLTTDNANILLQID	DNNIEQISSYKSEIT
GFGGGSFRGSYGS	TTDNANILLQIDNAR	IEQISSYKSEITELR
GGSFSGSYGS	NANILLQIDNARLAA	ISSYKSEITELRRNV
FRGSYGS	ILLQIDNARLAADD	YKSEITELRRNVQAL
SYGS	QIDNARLAADD	EITELRRNVQALEIE
SSSFGSYGS	NARLAADD	ELRRNVQALEIELQS
SSSFGSYGS	LAADD	RNVQALEIELQS
SSSFGSYGS	DDFRLKYENEVALRQ	QALEIELQS
SSSFGSYGS	RLKYENEVALRQSVE	QALEIELQS
SSSFGSYGS	YENEVALRQSVEADI	QALEIELQS
SSSFGSYGS	EVALRQSVEADINGL	QALEIELQS
SSSFGSYGS	LRQSVEADINGLRRV	QALEIELQS
SSSFGSYGS	SVEADINGLRRVLDE	QALEIELQS
SSSFGSYGS	ADINGLRRVLDELTL	QALEIELQS
SSSFGSYGS	NGLRRVLDELTLTKA	QALEIELQS
SSSFGSYGS	RRVLDELTLTKADLE	QALEIELQS
SSSFGSYGS	LDELTLTKADLEMQI	QALEIELQS
SSSFGSYGS	LTLTKADLEMQIESL	QALEIELQS
SSSFGSYGS	TKADLEMQIESLTEE	QALEIELQS
SSSFGSYGS	DLEMQIESLTEELAY	QALEIELQS
SSSFGSYGS	MQIESLTEELAYLKK	QALEIELQS
SSSFGSYGS	ESLTEELAYLKKNHE	QALEIELQS

LQQIRAETECQNTHEY	O	GGGYGGGTSGGGSSG
IRAETECQNTHEYQQL	O	GGSSGGGSSGGGYGG
ETECQNTHEYQQLLDI	O	GGSSGGGTSGGGYGG
CQNTHEYQQLLDIKIR	O	SGGGYGGGSSSSGGHG
TEYQQLLDIKIRLEN	;Cytoc Extra Peptide	SGGGLRGELHGGHGG
QQLLDIKIRLENEIQ	.pep	GHGGGSSSGHGGSSSSG
LDIKIRLENEIQTYR	VRYSSSKHYSSSRSG	SSSGGHAHSTGGYGG
KIRLENEIQTYRSL	VRYSSSKQFSSSRSG	GGHGGGSSSGHGGSSSG
LENEIQTYRSLLEGE	GGGGGGCGGGGVSSLR	SSSGGHGSSSSGGYG
EIQTYRSLLEGE GSS	SGGGGGGSSSLRISS	SGGYGGGSSGGGGGG
TYRSLLEGE GSSGGG	GFGGGSFRGSYGSSS	SGGYGGGNSGGGGGG
SLLEGE GSSGGGGRG	GFGGGSFHGSYGSSS	GGYGGGSSGGGGGGY
EGEGSSGGGGRRGGGS	GGSFGGGSFGGGSFG	GGYGGGSFGGGGGGY
GSSGGGRRGGGSFGG	GGSFGGGNFGGGSFG	GGGGYGGGSSGGGS
GGGRRGGGSFGGGYG	GKIKEWYKHNHSHQ	GGGGGLRGRHSGGGS
GRGGGSFGGGYGGGS	GKIKERYDQHGNHSHQ	GGSSSSGGHKSSSSG
GGSFGGGYGGGSSGG	YEKHGNSHQGEPRDY	SSGGGYGGGSSSGGHKS
FGGGYGGGSSGGGSS	YEKHGNSRQGEPRDY	O
GYGGGSSGGGSSGGG	QGEPRDYSKYKID	O
GGSSGGGSSGGGYGG	QGEPRDYGKYKID	O
SGGGSSGGGYGGGGH	LDELTLTKADLEMQI	O
GSSGGGYGGGHGGSS	LDELTLTQADLEMQI	O
GGGYGGGHGGSSGGG	QIESLTEELAYLKKNH	O
YGGGHGGSSGGGYGG	QIESLTEYVAYLKKNH	O
GHGGSSGGGYGGGSS	LAYLKKNHEEEMKDL	;Loricsc1 Peptide
GSSGGGYGGGSSGGG	LAYLKKNREEEMKDL	.pep
GGGYGGGSSGGGSSG	NHEEEMKDLRNVSTG	MSYQKKQPTPQPPVD
YGGGSSGGGSSGGGY	NHEEEMKHLRNVSTG	QKKQPTPQPPVDCVK
GSSGGGSSGGGYGGG	EMNAAPGVDLTQLLN	QPTPQPPVDCVKTS
GGGSSGGGYGGGSSS	EMNAAPGIDLTQLLN	PQPPVDCVKTSGGGG
SSGGGYGGGSSSGGH	QLLNMRNQYEQLA	PVDCVKTSGGGGGGG
GGYGGGSSSGHGGG	QLLNMRNQYEQLA	CVKTSGGGGGGGGSG
GGGSSSGHGGGSSS	RKDAEAWFNEKSKEL	TSGGGGGGGGSGGGG
SSSGGHGGGSSSGGH	RKDAEAWVNEKSKEL	GGGGGGGSGGGCGF
GGHGGGSSSGHGGGS	ELRRNVQALEIELQS	GGGGSGGGGCGFFGG
GGGSSSGHGGGSSSG	ELRRNVQRLIELQS	GSGGGCGGFFGGGGS
SSSGGHGGSSSGGYG	CVQLSQIQAQISALE	GGGCGFFGGGSGGG
GGHGGSSSGGYGGGS	CVQLSQIHAQISALE	CGFFGGGSGGGSSG
GGSSSGGYGGGSSGG	ALEEQLQQIRAETEC	FGGGSGGGSSGSGC
SSGGYGGGSSGGGGG	ALEEQLQEIRAETEC	GGSGGGSSGSGCGYS
GYGGGSSGGGGGGYG	NTEYQQLLDIKIRLE	GGSSSGSGCGYSGGG
GGSSGGGGGGYGGS	NTEYQQLTDIKIRLE	SSSGCGYSGGGGYS
SGGGGGGYGGGSSGG	NEIQTYRSLLEGE G	SGCGYSGGGGYSGGG
GGGGYGGGSSGGGSS	NEIQTYRGLLEGE G	GYSGGGYSGGGCGG
GYGGGSSGGGSSSGG	LEGE GSSGGGRGGG	GGGYSGGGCGGGSS
GGSSGGGSSSGGYG	LEGE GSSRSGGRGGG	GYSGGGCGGGSSGGG
SGGGSSSGGYGGGS	GGGYGGGSSGGGSSG	GGGCGGGSSGGGGG
GSSSGGGYGGGSSSG	GGGYGGGTSGGGSSG	CGGGSSGGGGGGGIG
SGGGYGGGSSSGGHK	GGSSGGGSSGGGYGG	GSSGGGGGGGIGGCG
GYGGGSSSGGHKSSS	GGSSGGGTSGGGYGG	GGGGGGGIGGCGGGS
GGSSSGGHKSSSSGS	GSSGGGYGGGHGGSS	GGGGIGGCGGGSGGS
SSGGHKSSSSSGSVGE	GGGSSGGGHGGSSSG	GIGGCGGGSGGSKY
GHKSSSSSGSVGE SSS	GGGHGGSSGGGYGGG	GCGGGSGGSKYSGG
SSSSSGSVGE SSKGP	SGGGYGGGSSSGGHG	GGSGGSKYSGGGGS
SSGSVGE SSKGP	GGGSSGGGSSGGGYGG	GGSKYSGGGGSSGG
O	GYGGGSSSGHGGGSSS	VKYSGGGGSSGGGSG
O	GGGYGGGSSGGGSSG	SGGGGSSGGGSGCFS



GGSSGGGSGCFSSGG	SGGGSGCGGGSSGGS	VGGSGSGKGVPICHQ
SGGGSGCFSSGGGGS	GSGCGGGSSGSGSG	SGSGKGVPICHQTQQ
GSGCFSSGGGSGCF	CGGGSSGSGSGYVS	GKGVPICHQTQQKQA
CFSSGGGSGCFSSG	GSSGSGSGYVSSQQ	VPICHQTQQKQAPTW
SGGGGSGCFSSGGG	GGSGSGYVSSQQVTQ	CHQTQQKQAPTWPSK
GGSGCFSSGGGSSG	GSGYVSSQQVTQTSC	;Loric Extra Peptide
GCFSSGGGSSGGGS	YVSSQQVTQTSCAPQ	.pep
SSGGGSSGGGSGCF	SQQVTQTSCAPQPSY	GGGGGGSGGGGCGF
GGGSSGGGSGCFSSG	VTQTSCAPQPSYGGG	GGGGGGGGGGGCGF
SSGGGSGCFSSGGG	TSCAPQPSYGGGSSG	GGGGGGSGGGGCGF
GGSGCFSSGGGSSG	APQPSYGGGSSGGG	GGGGGGGTGGGCGF
GCFSSGGGSSGGGS	PSYGGGSSGGGSGG	GGGSVCGYSGGSGC
SSGGGSSGGGSGCF	GGGSSGGGSSGSGC	GGSVCGYSGGSGGSG
GGGSSGGGSGCFSSG	SSGGGSGSGCFSS	O
SSGGGSGCFSSGGG	GGGSGSGCFSSGGG	O
GGSGCFSSGGGFSG	SGGSGCFSSGGGGS	O
GCFSSGGGFSGQAV	SGCFSSGGGGS	O
SSGGGFSGQAVQCQ	FSSGGGSSGCGGG	O
GGGFSGQAVQCQSYG	GGGGSSGCGGGSSG	O
FSGQAVQCQSYGGVS	GGSSGCGGGSSGIGS	O
QAVQCQSYGGVSSG	SGCGGGSSGIGSGCI	O
QCQSYGGVSSGGSSG	GGGSSGIGSGCIIISG	O
SYGGVSSGGSSGGGS	SSGIGSGCIIISGGGS	O
GVSSGGSSGGGSGCF	IGSGCIIISGGGSVCG	O
SGGSSGGGSGCFSSG	GCIISGGGSVCGGGS	O
SSGGGSGCFSSGGG	ISGGGSVCGGGSSG	O
GGSGCFSSGGGGGSV	GGSVCGGGSSGGGG	O
GCFSSGGGGGSVCGY	VCGGGSSGGGGGSS	O
SSGGGGGSVCGYSGG	GGSSGGGGGSSVGG	O
GGGGSVCGYSGGSG	SGGGGGGSSVGGSGS	O
GSVCGYSGGSGCGG	GGGGSSVGGSGSGK	O
CGYSGGSGCGGGSS	GSSVGGSGSGKGVPI	O

## Membran 2:

;Involsc1 Peptide	VPSKQEEKHMTAVKG	RDQQLNKQLEEEKKL
.pep	KQEEKHMTAVKGLPE	QLNKQLEEEKKLDDQ
MSQQHTLPVTLSPAL	EKHMTAVKGLPEQEC	KQLEEEKKLDDQQLD
QHTLPVTLSPALSQE	MTAVKGLPEQECEQQ	EEKKLLDDQQLDQEL
LPVTLSPALSQELLK	VKGLPEQECEQQQKE	KKLLDDQQLDQELVKR
TLSPALSQELLKTVP	LPEQECEQQQKEPQE	LDQQLDQELVKRDEQ
PALSQELLKTVPVPPV	QECEQQQKEPQEQL	QLDQELVKRDEQLGM
SQELLKTVPVPPVNT	EQQQKEPQEQLQQQ	QELVKRDEQLGMKKE
LLKTVPVPPVNTHEQ	QKEPQEQLQQQHWE	VKRDEQLGMKKEQLL
TVPPVNTHEQEMKQ	PQEQLQQQHWEQHE	DEQLGMKKEQLLELP
PPVNTHEQEMKQPTP	QELQQQHWEQHEEYQ	LGMKKEQLLELPEQQ
NTHQEMKQPTPLPP	QQQHWEQHEEYQKAE	KKEQLLELPEQQEGH
QEMKQPTPLPPPCQ	HWEQHEEYQKAENPE	QLLELPEQQEGHLKH
MKQPTPLPPPCQKVP	QHEEYQKAENPEQQQ	ELPEQQEGHLKHLEQ
PTPLPPPCQKVPVEL	EYQKAENPEQQQKQE	EQQEGHLKHLEQQEG
LPPPCQKVPVELPVE	KAENPEQQQKQEKTO	EGHLKHLEQQEGQLK
PCQKVPVELPVEVPS	NPEQQQKQEKTORDDQ	LKHLEQQEGQLKHPE
KVPVELPVEVPSKQE	QQQKQEKTORDDQLN	LEQQEGQLKHPEQQE
VELPVEVPSKQEEKH	KQEKTORDDQLNKQL	QEGQLKHPEQQEGQL
PVEVPSKQEEKHMTA	KTQRDDQLNKQLEEE	QLKHPEQQEGQLLELP

HPEQQEGQLELPEQQ  
QQEGQLELPEQQEGQ  
GQLELPEQQEGQLEL  
ELPEQQEGQLELPEQ  
EQQEGQLELPEQQEG  
EGQLELPEQQEGQLE  
LELPEQQEGQLELPE  
PEQQEGQLELPEQQE  
QEGQLELPEQQEGQL  
QLELPEQQEGQLELP  
LPEQQEGQLELPEQQ  
QQEGQLELPEQQEGQ  
GQLELPEQQEGQLEL  
ELPEQQEGQLELPQQ  
EQQEGQLELPQQQEG  
EGQLELPQQQEGQLE  
LELPQQQEGQLELSE  
PQQQEGQLELSEQQE  
QEGQLELSEQQEGQL  
QLELSEQQEGQLELS  
LSEQQEGQLELSEQQ  
QQEGQLELSEQQEGQ  
GQLELSEQQEGQLEL  
ELSEQQEGQLELSEQ  
EQQEGQLELSEQQEG  
EGQLELSEQQEGQLK  
LELSEQQEGQLKHLE  
SEQQEGQLKHLEHQE  
QEGQLKHLEHQEGQL  
QLKHLEHQEGQLEVP  
HLEHQEGQLEVPPEQ  
HQEGQLEVPPEQMGG  
GQLEVPPEQMGGQLKY  
EVPEEQMGGQLKYLEQ  
EEQMGGQLKYLEQQEG  
MGQLKYLEQQEGQLK  
LKYLEQQEGQLKHLD  
LEQQEGQLKHLDQQE  
QEGQLKHLDQQEKQP  
QLKHLDQQEKQPELP  
HLDQQEKQPELPEQQ  
QQEKQPELPEQQMGQ  
KQPELPEQQMGQLKH  
ELPEQQMGQLKHLEQ  
EQQMGGQLKHLEQQEG  
MGQLKHLEQQEGQPK  
LKHLEQQEGQPKHLE  
LEQQEGQPKHLEQQE  
QEGQPKHLEQQEGQL  
QPKHLEQQEGQLEQL  
HLEQQEGQLEQLEEQ  
QQEGQLEQLEEQQEG  
GQLEQLEEQQEGQLKH

EQLEEQEGQLKHLEQ  
EEQEGQLKHLEQQEG  
EGQLKHLEQQEGQLE  
LKHLEQQEGQLEHLE  
LEQQEGQLEHLEHQE  
QEGQLEHLEHQEGQL  
QLEHLEHQEGQLGLP  
HLEHQEGQLGLPEQQ  
HQEGQLGLPEQQVLQ  
GQLGLPEQQVLQLKQ  
GLPEQQVLQLKQLEK  
EQQVLQLKQLEKQQG  
VLQLKQLEKQQGQPK  
LKQLEKQQGQPKHLE  
LEKQQGQPKHLEEEE  
QQGQPKHLEEEEGQL  
QPKHLEEEEGQLKHL  
HLEEEEGQLKHLVQQ  
EEEGQLKHLVQQEGQ  
GQLKHLVQQEGQLKH  
KHLVQQEGQLKHLVQ  
VQQEGQLKHLVQQEG  
EGQLKHLVQQEGQLE  
LKHLVQQEGQLEQQE  
LVQQEGQLEQQERQV  
QEGQLEQQERQVEHL  
QLEQQERQVEHLEQQ  
QQERQVEHLEQQVGQ  
RQVEHLEQQVGQLKH  
EHLEQQVGQLKHLEE  
EQQVGQLKHLEEQEG  
VGQLKHLEEQEGQLK  
LKHLEEQEGQLKHLE  
LEEQEGQLKHLEQQQ  
QEGQLKHLEQQQGQL  
QLKHLEQQQGQLEVP  
HLEQQQGQLEVPPEQQ  
QQQGQLEVPPEQQVGQ  
GQLEVPPEQQVGQPKN  
EVPEQQVGQPKNLEQ  
EQQVGQPKNLEQEEK  
VGQPKNLEQEEKQLE  
PKNLEQEEKQLELPE  
LEQEEKQLELPEQQE  
EEKQLELPEQQEGQV  
QLELPEQQEGQVKHL  
LPEQQEGQVKHLEKQ  
QQEGQVKHLEKQEAQ  
GQVKHLEKQEAQLEL  
KHLEKQEAQLELPEQ  
EKQEAQLELPEQQVG  
EAQLELPEQQVGQPK  
LELPEQQVGQPKHLE

PEQQVGQPKHLEQQE  
QVGQPKHLEQQEKHL  
QPKHLEQQEKHLEHP  
HLEQQEKHLEHPEQQ  
QQEKHLEHPEQQDGQ  
KHLEHPEQQDGQLKH  
EHPEQQDGQLKHLEQ  
EQQDGQLKHLEQQEG  
DGQLKHLEQQEGQLK  
LKHLEQQEGQLKDLE  
LEQQEGQLKDLEQQK  
QEGQLKDLEQQKGQL  
QLKDLEQQKGQLEQP  
DLEQQKGQLEQPVFA  
QQKGQLEQPVFAPAP  
GQLEQPVFAPAPGQV  
EQPVFAPAPGQVQDI  
VFAPAPGQVQDIQPA  
PAPGQVQDIQPALPT  
GQVQDIQPALPTKGE  
QDIQPALPTKGEVLL  
QPALPTKGEVLLPVE  
LPTKGEVLLPVEHQQ  
KGEVLLPVEHQQQKQ  
VLLPVEHQQQKQEVQ  
PVEHQQQKQEVQWPP  
HQQQKQEVQWPPKHK  
O  
O  
O  
O  
O  
O  
O  
O  
O  
O  
;Invol Extra  
Peptide  
.pep  
QQLKQEKTRDQQLN  
QQLKQEKARQDQQLN  
QEGHLKHLEQQEGQL  
QEGHLKHPEQQEGQL  
EQQEGQLKHPEQQEG  
EQQEGQLEHPEQQEG  
EGQLELSEQQEGQLE  
EGQLELSQQQEGQLE  
LPEQQMGQLKHLEQQ  
LPEQQMGKLKHLEQQ  
LPEQQEGQVKHLEKQ  
LPEQQEGQLKHLEKQ  
O

## Danksagung

Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich ganz herzlich für die Übernahme der Mentorenschaft, PD Dr. Max Schobert und Prof. Dr. Siegmund Lang möchte ich für die Bereitschaft der Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes danken.

Ganz besonders herzlich möchte ich meinem Betreuer Dr. Dr. Werner Tegge danken. Zum einen danke ich dir für deine hervorragende fachliche Betreuung und die freitäglichen Besprechungen, zum anderen möchte ich dir ganz besonders für die persönliche Unterstützung danken.

Dr. Raimo Franke danke ich ganz herzlich für die hervorragende Auswertung der Transkriptom-Daten und jegliche statistische Unterstützung. Du hast erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. A. Peschel und Dr. Bernhard Krismer danke ich für die Bereitstellung des ANM und einiger *S. aureus* Stämme. Besonders möchte ich mich zudem für den zweiwöchigen Gastaufenthalt in den Forschungslaboren der Universität Tübingen im Sommer 2008 und die exzellente Unterstützung dort bedanken. Ich habe diese Zeit in sehr guter Erinnerung.

Den Mitgliedern meines Thesis-Komitees Prof. Dr. Susanne Häußler und Dr. Florenz Sasse möchte ich für ihre Bereitschaft danken, mein Thesis-Komitee zu bilden. Ihr habt meine Arbeit mit Ideen und Tipps hilfreich gefördert.

Meiner (Ex-)Lieblingskollegin und Freundin Dr. Randi Diestel danke ich besonders für jegliche Hilfe mit dem IXM, das ja so manches Mal seinen eigenen Kopf hatte. Am meisten jedoch danke ich dir dafür, dass du jederzeit für mich da warst und stets ein offenes Ohr hast.

Auch bei Dr. Marc Reboll möchte ich mich an dieser Stelle für die fachlichen Diskussionen und die Bereitschaft bedanken, mir jederzeit mit Rat und Tat auszuweichen.

Tanja Hirsch und Dr. Peter Washausen danke ich für die Pflege und Instandhaltung der Substanzsammlungen und die Beschaffung von Nachsubstanz, Bettina Hinkelmann und Wera Collisi danke ich für jegliche zellkulturbasierte Hilfe.

Tabea Ellebracht danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Screening-Experimente. Ich wünsche dir für deinen weiteren Lebensweg und dein Studium alles Gute!

Meinen Bürokollegen und -innen Galina Sergeev, Ulrike Beutling und Dr. Marc Reboll danke ich für eine angenehme Atmosphäre im Büro und das ein oder andere kleine aufmunternde Gespräch zwischendurch. Ulrike möchte ich an dieser Stelle zusätzlich für die souveräne Beseitigung jeglicher EDV-Probleme danken.

Bei der gesamten Abteilung CBIO möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Den Serviceeinheiten bzw. den Abteilungen des HZI – Peptidsynthese-Plattform, Genomanalytik, Biophysikalische Analytik, Makromolekulare Interaktionen – möchte ich für verschiedene Serviceleistungen wie ESI-MS-Messungen, Sequenzierungen etc. sowie freundliche Hilfestellungen danken.

Besonders Lili, Anne, Dorina und Knud danke ich für tolle Freundschaften, lange und intensive Telefongespräche, leckere Burgeressen bzw. gemeinsame Sporteinheiten, die für Spaß und Ausgleich zur Arbeit sorgten und das Leben verschönern.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Steffi und meinem Schwager Michi, die stets für mich da waren und mir jederzeit und in jeglicher Form Unterstützung und Halt gaben. Auch Renata und Ludwig möchte ich ganz herzlich danken.

Meinem Mann Konrad, der mich schon durch viele Lebenslagen begleitet hat, danke ich ganz besonders. Ich genieße das Leben mit dir in vollen Zügen und du bist immer wirklich für mich da. Daraus konnte ich viel Kraft zur Anfertigung dieser Arbeit schöpfen. Ich danke dir an dieser Stelle für deine liebevolle Geduld und deine stetige Unterstützung.